

Aus der Poliklinik für Zahnerhaltung, Parodontologie, Endodontologie,
Kinderzahnheilkunde und Präventive Zahnheilkunde
(Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. dent. Thomas Kocher)
im Zentrum für Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde
(Geschäftsführender Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. dent. Reiner Biffar)
der Universitätsmedizin der Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald

**Validitätsstudie zur Assoziation von Speichelperoxidase-Aktivität
und -Konzentration mit der parodontalen Gesundheit**

Inaugural - Dissertation

zur

Erlangung des akademischen

Grades

Doktor der Zahnmedizin
(Dr. med. dent.)

der

Universitätsmedizin

der

Ernst-Moritz-Arndt-Universität

Greifswald

2017

vorgelegt von: Maral Gärtner
geboren am: 06.12.1982
in: Teheran, Iran

Dekan: Prof. Dr. rer. nat. Max P. Baur

1. Gutachter: PD Dr. A. Welk

2. Gutachter: Prof. Dr. N. B. Arweiler

Ort, Raum: Hörsaal des Zentrums für Zahn-, Mund und Kieferheilkunde der
Universitätsmedizin Greifswald

Tag der Disputation: 05.04.2018

Für Annelie und Robert

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	<i>Peroxidase-System in der Mundhöhle</i>	2
1.1.1	Peroxidasen	2
1.1.2	Pseudohalogenid-SCN ⁻	3
1.1.3	Wasserstoffperoxid	3
1.2	<i>Peroxidase-System und die parodontale Gesundheit</i>	3
1.3	<i>Zielsetzung</i>	5
2	Material und Methode	6
2.1	<i>Administrative Vorbereitungen</i>	6
2.2	<i>Probandengewinnung</i>	6
2.3	<i>Kalibrierung</i>	7
2.4	<i>Speichelentnahme</i>	7
2.5	<i>Zahnmedizinische Untersuchung</i>	7
2.6	<i>Bestimmung der SPO Konzentration und Aktivität</i>	8
2.7	<i>Statistische Methoden</i>	10
3	Ergebnisse	11
3.1	<i>Probandencharakteristika</i>	11
3.2	<i>Biologische Variabilität der SPO-Werte über den Tag</i>	12
3.3	<i>Speichelperoxidase und Sondierungstiefe</i>	13
3.4	<i>Speichelperoxidase und Attachmentverlust</i>	18
4	Diskussion	22
5	Zusammenfassung	26
6	Literaturverzeichnis	28
7	Anhang	32
7.1	<i>Patientenaufklärung</i>	32
7.2	<i>Patienteneinwilligung</i>	36
7.3	<i>Bisherige Veröffentlichungen der Ergebnisse</i>	38
7.4	<i>Verlagserlaubnis</i>	48
7.5	<i>Danksagung</i>	49

1 Einleitung

Trotz aller Erfolge in der Erhöhung der Zahngesundheit der letzten Jahrzehnte ist die Prävalenz von parodontalen Erkrankungen immer noch relativ hoch. Mehr als die Hälfte der Bevölkerung in Deutschland ist von Parodontitis betroffen, wobei bis zu 20% derzeit eine schwere Formen der Parodontitis aufweisen [1]. Aufgrund der demografischen Entwicklung in Deutschland und der Verlagerung von chronischen oralen Erkrankungen in ein höheres Lebensalter sind entsprechende Präventions- und Behandlungsmaßnahmen für die Zukunft notwendig.

Die Rolle der Bakterien in der Ätiologie und Pathogenese der parodontalen Erkrankungen wurde durch zahlreiche Studien hinreichend belegt. Allerdings konnte gezeigt werden, dass die Mikroorganismen, die mit parodontalen Erkrankungen assoziiert sind, auch in der Mundhöhle von parodontal gesunden Patienten vorhanden sein können [2]. Damit sind sie zwar eine notwendige, aber keine hinreichende Voraussetzung für die Entwicklung der Parodontitis. Eine Entzündung und Destruktion des parodontalen Gewebes tritt nur dann auf, wenn die Anzahl der Bakterien und ihre schädlichen Stoffwechselprodukte eine gewisse Schwelle des Wirtswiderstandes überschreitet [3]. Auf der anderen Seite lässt eine inadäquate Immunabwehr das Wachstum und die Besiedlung der Bakterien in den parodontalen Taschen zu. Dafür ist die Rolle des Abwehrsystems der Mundhöhle, z. B. das Peroxidase-System, von großer Bedeutung.

1.1 Peroxidase-System in der Mundhöhle

Das Peroxidase-System im menschlichen Speichel, als Teil der unspezifischen Immunabwehr in der Mundhöhle, besteht aus Peroxidase-Enzymen, Wasserstoffperoxid (H_2O_2) und Thiocyanat-Ion (SCN^-).

1.1.1 Peroxidasen

Die Peroxidasen sind spezielle Speichelenzyme, die die antimikrobielle Substanz Hypothiocyanit (OSCN^-) unter Anwesenheit von H_2O_2 und SCN^- produzieren. Zusätzlich zu SCN^- oxidieren die Peroxidasen andere anorganische Anionen wie Chlorid (Cl^-), Bromid (Br^-), Iod (I^-) und Cyanid (CN^-) zu antimikrobiellen Substanzen [4, 5].

Die Peroxidaseenzyme im menschlichen Körper werden mit verschiedenen exo- und endokrinen Sekreten ausgeschieden und spielen eine entscheidende Rolle bei der angeborenen Immunabwehr. Zu diesen Sekreten gehören: Speichel, Muttermilch [6, 7] und Tränenflüssigkeit [8] sowie die Sekrete der Lungen [9, 10].

Der Begriff Oralperoxidase (OPO) umfasst alle im Speichel vorhandenen Peroxidasen: Human Speichelperoxidase (SPO), Myeloperoxidase (MPO) und Eosinophile Peroxidase (EPO). Die SPO wird in den drei Speicheldrüsen (submandibulär, sublingual, Parotis) produziert und mit dem Speichel in die Mundhöhle ausgeschieden, wo es die Oxidation von SCN^- zu OSCN^- katalysiert. Die MPO wird in den neutrophilen Granulozyten des Blutes produziert und erreicht die Mundhöhle via Sulkusflüssigkeit [11]. Eine erhöhte Anzahl von MPO-sezernierenden Granulozyten in der Sulkusflüssigkeit deutet auf eine Infektion bzw. eine Entzündung des parodontalen Gewebes (wie Gingivitis) hin [12]. Ähnlich wie die SPO ist auch MPO in der Lage die antimikrobielle OSCN^- -Verbindung zu produzieren [13]. Darüber hinaus ist es auch in der Lage, Chlorid (Cl^-) und Bromid (Br^-) zu Hypochlorit (OCl^-) und Hypobromit (OBr^-) zu oxidieren [14]. Die dritte Speichelperoxidase ist die EPO, die sich in den eosinophilen Granulozyten des Blutes bildet und wie MPO über die Sulkusflüssigkeit bzw. bei Sulkusblutungen in die Mundhöhle gelangt und dort die gleiche Funktion wie MPO ausübt [15]. Ihr Anteil an der Gesamtaktivität der OPO ist am geringsten, da die eosinophilen Granulozyten nur einen kleinen Teil der Leukozyten im Körper ausmachen.

1.1.2 Pseudohalogenid-SCN⁻

Ein Co-Substrat von SPO ist SCN⁻. Wie bereits erwähnt, ist SCN⁻ ein wichtiger Bestandteil bei der Synthese von OSCN⁻. SCN⁻ wird im Körper durch die Entgiftung von schädlichem Cyanid in den Mitochondrien produziert und ist damit ubiquitär in Geweben und Sekreten vorhanden [16].

Die Hauptreaktion von SPO bei neutralem pH-Wert stellt die Oxidation von SCN⁻ zum antimikrobiellen OSCN⁻ dar, wobei H₂O₂ als Sauerstoffdonator dient.

1.1.3 Wasserstoffperoxid

Wasserstoffperoxid (H₂O₂) befindet sich in allen aeroben Lebewesen (Bakterien, Menschen). Es ist ein unerwünschtes Nebenprodukt, z. B. in der Atmungskette in den Mitochondrien und bei der Oxidation von Fettsäuren. Es kann auch in den neutrophilen Granulozyten produziert werden, um als Teil der aktiven Immunantwort die pathogene Mikroorganismen anzugreifen [17]. Aufgrund der starken Oxidationswirkung und der damit verbundenen Toxizität von H₂O₂ produzieren alle aeroben Organismen schützende Enzyme, um die H₂O₂-Konzentration in ihren Zellen zu kontrollieren. Diese Schutzenzyme schließen die Katalasen und Peroxidasen ein.

Einige Bakterien der Mundhöhle produzieren H₂O₂ als metabolisches Nebenprodukt. Dazu gehören die oralen Streptokokken wie Streptococcus mitis und Streptococcus sanguinis [18]. Darüber hinaus wird H₂O₂ direkt von den Speicheldrüsen ausgeschieden [19].

1.2 Peroxidase-System und die parodontale Gesundheit

Parodontitis wird durch Bakterien-induzierte Entzündungen des Parodontiums (Gingiva, Alveolarknochen, Zement und Parodontalband) verursacht und ist durch entzündungsbedingte irreversible Veränderungen, wie die Zerstörung von parodontalen Weichgeweben und alveolärem Knochenverlust, gekennzeichnet.

Viele Studien haben Risikofaktoren aufgezeigt, die die Wahrscheinlichkeit einer parodontalen Erkrankung erhöhen, wie beispielsweise Genetik, Rauchen, Diabetes, Stress und schlechte Mundhygiene [20]. Allerdings haben neuere Studien die Rolle von H₂O₂ in der Pathogenese und Entwicklung der Parodontitis [21] belegt. Es wurde

gezeigt, dass H_2O_2 eine parodontale Ligamentenzell (PDL) -apoptose und damit die Zerstörung von spezialisierten Parodontalfasern induzieren kann [22] .

So schützt das Peroxidase-System die orale Schleimhaut- und Zahnfleischgewebe gegen die Zytotoxizität von H_2O_2 im Speichel, indem es den Sauerstoff vom H_2O_2 für die Oxidation von SCN^- zu OSCN^- verwendet [23].

Als Hauptprodukt des Peroxidase-Systems wirkt OSCN^- auf unterschiedliche Weise auf die orale Bakterienflora durch die Oxidation der Sulfhydrylgruppen von essentiellen Enzymen und anderen Proteinen der Bakterien zu Sulfonsäuren [19]. Ein kritischer Punkt der Bakterien stellt in diesem Fall die Glykolyse dar, da einer der wichtigsten energiezuführenden Enzyme für den Bakterienmetabolismus, die Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase, eine Sulfhydrylgruppe enthält. Die Oxidation der Sulfonsäure durch die Anwesenheit von OSCN^- schädigt das Enzym irreversibel und beeinträchtigt die Gesamtenergiebilanz der Bakterienzelle [18].

Die zytoplasmatische Membran von Bakterien enthält auch Sulfhydrylgruppen, die durch OSCN^- beschädigt werden können. Als Ergebnis passieren die Kaliumionen, Aminosäuren und Peptide ungehindert die Zellmembran und stören damit das osmotische Gleichgewicht der Zelle. Weiterhin wird die Synthese von Proteinen und Nukleinsäuren gehemmt [24].

Abhängig von der Konstitution der einzelnen Bakterienarten hat OSCN^- bakteriostatische oder bakterizide Effekte. Gram-negative Bakterien sind empfindlicher für dieses System als gram-positive Bakterien. Die Gründe dafür sind in der unterschiedlichen Struktur der Zellmembran und in Gegenwart unterschiedlicher Verteidigungsbarrieren zu suchen [25, 26]. Anaerobe Bakterien reagieren viel empfindlicher auf OSCN^- als aerobe Bakterien, die eine signifikant höhere Aktivität der NADH- OSCN^- Oxidoreduktase haben, die OSCN^- wieder zu SCN^- reduziert [18, 27].

Die Assoziation zwischen MPO und Parodontitis ist weitgehend untersucht und durch viele Studien belegt. Die MPO-Aktivität und -Konzentration bei Patienten mit Parodontitis sind im Vergleich zu parodontal gesunden Erwachsenen erhöht [28, 29]. Im Gegensatz zu MPO sind die SPO-Werte unabhängig von Entzündungen [30]. Wegen der schützenden Rolle von SPO gegen bakterielle Infektionen kann eine umgekehrte Assoziation zwischen SPO-Aktivität und -Konzentration im Speichel und parodontalen Sondierungstiefen erwartet werden. In der Tat berichteten Saxén et al.

1990 über eine solche inverse Wirkung für die SPO-Aktivität [31]. Andere Studien haben keine Assoziation zwischen SPO-Niveaus und Plaque-, Gingiva- oder Parodontalindizes gezeigt [32-34].

1.3 Zielsetzung

Ziel dieser Studie war die Untersuchung einer möglichen Assoziation zwischen dem SPO-Enzym und der parodontalen Gesundheit. Durch Erhebung und Analyse von jeweils fünf Messungen der SPO-Aktivität und -Konzentration über den Tag wurde die biologische Variabilität beurteilt und die Reliabilität der SPO-Messung erhöht. Diese Assoziation wurde nicht nur in der vorliegenden Studie analysiert, sondern auch mit Bezug auf die Allgemeinbevölkerung, wodurch der Selektionsbias minimiert und die Unsicherheit der Effektschätzungen reduziert wurden. Dafür wurden die Daten einer bevölkerungsrepräsentativen Studie der gleichen Region verwendet (SHIP-TREND). Wie für Untersuchungen zur Ätiologie erforderlich, wurde eine kontinuierliche Zielgröße gewählt [35], die auch das subklinische Krankheitsbild erfasst [36].

2 Material und Methode

2.1 Administrative Vorbereitungen

Die Erlaubnis zur Durchführung der Studie wurde bei der Ethik-Kommission der Universitätsmedizin Greifswald beantragt und unter der Antragsnummer BB 015/14 genehmigt.

2.2 Probandengewinnung

Jeder Proband wurde schriftlich aufgeklärt und erklärte mit seiner Unterschrift die freiwillige Teilnahme an der geplanten Studie (s. Anhang). Die Teilnehmer der Untersuchung setzten sich aus Patienten des Zentrums für Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde der Universitätsmedizin Greifswald zusammen.

Die Anamnesebogen der Patienten gaben Aufschluss über eventuelle Vorerkrankungen. Somit konnten Probanden bereits vor Beginn der Untersuchungen aus anamnestischen Gründen von der Studie ausgeschlossen werden.

Ausschlusskriterien waren:

- Immunsupprimierung;
- Speicheldrüsenerkrankungen;
- Organtransplantation;
- Patienten, bei denen eine Endokarditisprophylaxe erforderlich ist;
- Vorliegen von Hepatitis A, B, C, Tuberkulose, HIV;
- Patienten mit Niereninsuffizienz;
- Suchtkranke Patienten (z. B. Raucher);
- Schwangere / orale Kontrazeptiva;
- Diabetiker;
- Einnahme von Antibiotika oder NSAIDs;
- Scaling und Rootplaning in den letzten sechs Monaten;
- Tägliche Verwendung von oralen Antiseptika;

2.3 Kalibrierung

Die Dentaluntersuchungen wurden von einem ausgebildeten und für SHIP kalibrierten Untersucher (M.G.) durchgeführt. Um eine exakte Reproduzierbarkeit der Messergebnisse zu gewährleisten, wurden die Messungen im Abstand von jeweils sieben Tagen so lange wiederholt, bis die Einzelwerte jedes der fünf Patienten, bei aufeinander folgenden Messungen, nahezu identisch waren.

2.4 Speichelentnahme

Fünfmal täglich wurden jeweils fünf Milliliter unstimulierter Speichel durch Spuckverfahren gesammelt. Die erste Probe wurde um 8 Uhr genommen und alle zwei Stunden wiederholt. Die Probanden wurden angewiesen, 60 Minuten vor der Speichelsammlung keine Nahrung und Getränke (außer Wasser) einzunehmen sowie Mundhygienemaßnahmen zu unterlassen.

Die Proben wurden in versiegelte Kolben mit kontrollierter Temperatur von 0-4 Grad in der Zahnklinik der Universitätsmedizin Greifswald gesammelt. Die Flaschen wurden unmittelbar nach der Probenahme für analytische Tests zum Labor des Instituts für Hygiene und Umweltmedizin Greifswald transportiert und innerhalb von 30 Minuten analysiert.

2.5 Zahnmedizinische Untersuchung

In der Zeit vom 10. März 2015 bis 21. August 2015 wurden die Probanden in der Zahnklinik der Universitätsmedizin Greifswald untersucht. Eine Gruppe von 46 Teilnehmern (28-53 Jahre) nahm an dieser Studie teil. Die zahnmedizinischen Untersuchungen wurden nach der letzten Probensammlung um 16 Uhr durchgeführt.

Die parodontale Sondierungstiefe und der klinische Attachmentverlust wurden unter Verwendung von CP 15 UNC-Sonden (HU-Friedy Europe, Leimen, Deutschland) an 6 Oberflächenstellen pro Zahn: mesiobukkal, bukkal, distobukkal, mesiooral, oral und distooral erhoben. Zur Messung der Sondierungstiefe führte der Untersucher die Sonde leicht zwischen Zahn und Zahnfleisch ein, wobei die aufzuwendende Kraft zwischen 20 und 25 g liegen sollte.

Die Plaque wurde intraoral mit einer Indikatorlösung (MIRA-2-TON, Hager & Werken,

Duisburg, Deutschland) dargestellt und anhand des nach Turesky [37] modifizierten Quigley-Hein-Plaque-Index dokumentiert [38].

Für den Entzündungsgrad der Gingiva wurden der Gingiva-Index [39] verwendet. Auch Zahnkaries-Indizes, einschließlich DMF-T, DMF-S, DF-S und DS, wurden erhoben. Der Untersucher zählte dazu die Zähne (T) / Flächen (S) mit konservierender Füllungs- bzw. prothetischer Kronenversorgung (F = filled), sowie fehlende (M = missed) und Karies (D = decayed). Die resultierenden Werte wurden addiert und repräsentieren den DMF-T/DMF-S-Wert des Patienten. Ein hoher DMF-T steht für einen höheren Sanierungsgrad bzw. -bedarf [40].

2.6 Bestimmung der SPO Konzentration und Aktivität

Die Konzentration von SPO im Speichel wurde unter Verwendung eines Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) Kits bestimmt. Verwendet wurde der *ELISA Kit for human LPO* (USCN Life Science Inc., China) mit einer minimalen nachweisbaren Dosis an humaner SPO von weniger als 8,1 nmol/l.

Die Bestimmung der SPO Konzentration erfolgte entsprechend der Kit-Vorschrift. Das beinhaltet die folgenden Schritte. In die Wells der mit einem für SPO spezifischen Antikörper vorbeschichteten Mikrotiterplatte wurden jeweils 100 µl LPO-Standard oder Probe gegeben. Nachdem die beladene Mikrotiterplatte mit einer Folie (Plate Sealer) abgedeckt wurde, erfolgte für 2 h eine Inkubation bei 37 °C. Danach wurde jegliche Flüssigkeit aus den Wells entfernt, eine Biotin-konjugierte Antikörper-Arbeitslösung (Detektionsreagenz A) in jedes Well gegeben und für 1 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend erfolgte die Entfernung von überschüssigem Detektionsreagenz A durch Ausklopfen der Platte auf einer saugfähigen Unterlage und die Platte wurde 3x mit Waschpuffer gespült. Dann wurden 100 µl der Detektionslösung B (Avidin, konjugiert an Meerrettichperoxidase) in die Wells gegeben und das Ganze für 30 min bei 37 °C inkubiert. Nach erneuten 5x waschen mit Waschpuffer wurden 90 µl TMB-Substratlösung zugegeben und für 20-25 min bei 37 °C inkubiert.

Nach der Inkubation wurden in jedes Well 50 µl Abstopplösung (Schwefelsäure) gegeben und die Intensität des gebildeten Farbstoffes wurde spektrophotometrisch

bei einer Wellenlänge von 450 nm gemessen. Die Konzentration von SPO in den Proben berechnet sich aus einer Kalibrierkurve.

Die Peroxidase-Aktivität wurde spektrophotometrisch unter Verwendung von o-Phenylendiamin zur Erzeugung eines Chromogens bestimmt [33]. Im Speichel liegen immer mehrere Peroxidasen nebeneinander vor. Mengenmäßig am bedeutendsten sind SPO und MPO. Die Aktivität der anderen Peroxidasen ist im Normalfall zu vernachlässigen. Da Methoden zur Peroxidaseaktivitätsbestimmung a priori nicht selektiv für eine Peroxidase sind, erfolgte die Bestimmung der SPO-Aktivität in zwei Stufen. Zuerst wurde die Gesamt-Peroxidaseaktivität bestimmt. Danach erfolgte eine selektive Hemmung der SPO durch Dapsone und die Peroxidaseaktivität wurde erneut bestimmt. Die SPO-Aktivität ergibt sich aus der Differenz der Gesamt-Peroxidasaktivität und der Aktivität nach selektiver Hemmung der SPO.

Zur Bestimmung der Gesamt-Peroxidaseaktivität wurden 0,4 ml Probe oder Kalibrierstandard in eine bei 25 °C thermostatisierte Küvette zu 2 ml Substratlösung (1% o-Phenylendiamin in Phosphatpuffer pH 7,0) gegeben. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 100 µl H₂O₂ (1,0 %) gestartet und nach 10 min durch Zugabe von 1 ml H₂SO₄ (40%) gestoppt. Danach wird die Extinktion der Lösung bei 492 nm gemessen wurde. Für jede Probe erfolgt eine Doppelbestimmung. Für Blindwerte wurden das H₂O₂ durch 100 µl Wasser ersetzt. Die Peroxidase-Aktivität wurde mittels einer Kalibrierkurve bestimmt.

Anschließend wurde die Rest-Peroxidaseaktivität, die im Wesentlichen der MPO-Aktivität entspricht, nach Zugabe von Dapson, einem selektiven SPO-Inhibitor, bestimmt [41]. Dazu wurden 0,2 ml Probe mit 0,2 ml Dapson-Lösung (4 mmol/100 ml) versetzt und zu 2 ml o-Phenylendiamin-Lösung gegeben. Analog der Bestimmung der Gesamt-Peroxidaseaktivität wurde dann die Reaktion durch Zugabe von 100 µl H₂O₂ gestartet, die Reaktion nach 10 min durch Zugabe von 1 ml H₂SO₄ gestoppt und die Extinktion der Lösung bei 492 nm bestimmt. Abschließend wurde die SPO-Aktivität als Differenz zwischen der Gesamt-Peroxidaseaktivität und der MPO-Aktivität berechnet.

2.7 Statistische Methoden

Die mittlere Sondierungstiefe diente als primäre Zielgröße [42]; sie wurde durch eine Gamma-Verteilung [43] modelliert. Für jede kontinuierliche Variable im Modell wurden Abweichungen von einem linearen Zusammenhang mit der Zielgröße zugelassen. Für die beiden Expositionen SPO-Aktivität und -Konzentration wurde der Effekt des Interquartilsabstands (Zielgröße beim 3. Quartil der Exposition minus Zielgröße beim 1. Quartil der Exposition bzw. Zielgröße beim Median der oberen Hälfte der Exposition minus Zielgröße beim Median der unteren Hälfte der Exposition) berechnet und in Tabellen und Grafiken präsentiert.

Der Intra Class Correlation Coefficient (ICC) wurde berechnet, um die Reliabilität einer Messung und die biologische Variabilität über den Tag zu beschreiben.

Es wurde eine einfache Methode gewählt, um den Stichprobenumfang zu ermitteln [44]: die Stichprobengröße von zwei erfolgreichen Studien [31, 45] wurde als ein guter Indikator für den benötigten Stichprobenumfang angesehen. Retrospektiv wurde dann mit einer kürzlich vorgeschlagenen Methode überprüft, ob die Studie eine hohe statistische Power aufwies [46].

Zweiseitige p -Werte $<0,05$ wurden als statistisch signifikant angesehen, aber dem 2016 veröffentlichten Statement der American Statistical Association folgend wurde ein übermäßiges Vertrauen in p -Werte vermieden [47]. Die statistischen Analysen wurden mit Stata / MP Software, Version 14.2 (StataCorp LP, College Station, TX, USA) und R (R Development Core Team, Wien, Österreich) durchgeführt.

3 Ergebnisse

3.1 Probandencharakteristika

Insgesamt konnten 46 Patienten (w=22; m=24) in die Untersuchung einbezogen werden. Das durchschnittliche Alter der Patienten betrug 38.6 Jahre. Tabelle 1 gibt einen Überblick über die Patientencharakteristika: Geschlecht, Alter, Bildung und klinische Karies und parodontale Parameter.

Um einen Selektionsbias zu vermeiden, wurden die Daten mithilfe von externen Informationen aus der Baseline-Untersuchung der bevölkerungsrepräsentativen Studie über Gesundheit in Pommern (SHIP-TREND) korrigiert [48].

Tabelle 1: Probandencharakteristika. Die Daten sind als Median (1. Quartil, 3. Quartil) oder Anzahl (%) angegeben. DMFT, kariöse, fehlende oder gefüllte Zähne; DMF-S, kariöse, fehlende oder gefüllte Flächen; DF-S, kariöse oder gefüllte Flächen; D-S, kariöse Flächen; GI, Zahnfleischindex; QHI, Quigley-Hein Plaque Index; SPO, Speichelperoxidase.

	Ohne Gewichtung	Mit relativer Gewichtung
Alter, Jahre	37,5 (32; 44)	42 (33; 47)
Geschlecht, Frauen	22 (48)	23 (49)
Schulische Ausbildung		
<10 Jahre	4 (9)	2 (5)
10 Jahre	30 (65)	26 (56)
>10 Jahre	12 (26)	18 (39)
Zähne, Anzahl	28 (27; 28)	28 (27; 28)
DMF-T	9,5 (3; 16)	12 (6; 20)
DMF-S	16,5 (6; 40)	31 (12; 58)
DF-S	16 (6; 40)	30 (12; 44)
D-S	2 (0; 4)	0 (0; 3)
Attachmentverlust, mm	2,62 (2,27; 3,16)	2,62 (2,32; 3,17)
Sondierungstiefe, mm	2,48 (2,21; 2,96)	2,48 (2,23; 2,87)
GI	0,39 (0,16; 0,80)	0,40 (0,17; 0,80)
QHI	2,00 (0,93; 2,36)	2,14 (1,20; 2,72)
Mittlere SPO-Aktivität, U/ml	3,03 (2,43; 4,12)	3,10 (2,47; 4,35)
Mittlere SPO-Konzentration, ng/ml	15,6 (8,72; 19,2)	16,7 (9,74; 20,1)

3.2 Biologische Variabilität der SPO-Werte über den Tag

Die Ergebnisse haben gezeigt, dass die SPO-Aktivität von der Tageszeit abhängig ist (Abb. 1). In einem linearen gemischten Modell mit der Tageszeit als festem Faktor [49] betrug der Anstieg mit der Tageszeit 0,18 U/ml (95% CI: 0,10 – 0,26, $p < 0,0001$). Es zeigte sich eine gewisse Abweichung von der Linearität (Abb. 1). Die ICC von 0,648 erhöhte sich auf 0,671 nach Adjustierung nach der Tageszeit und auf 0,675 nach Adjustierung nach der Tageszeit und der quadrierten Tageszeit. Die ICC von 0,648 für eine einzelne Messung erhöhte sich auf 0,902 durch Mittelung der fünf Messungen, wie sie in der Hauptanalyse verwendet wurden.

Für die SPO-Konzentration betrug der lineare Anstieg mit der Tageszeit 0,36 (95% CI: -0,08 – 0,80, $p = 0,11$). Es gab keine wesentliche Abweichung von der Linearität. Die ICC von 0,673 für eine einzelne Messung erhöhte sich auf 0,912 durch Mittelung der fünf Messungen, wie sie in der Hauptanalyse verwendet wurden.

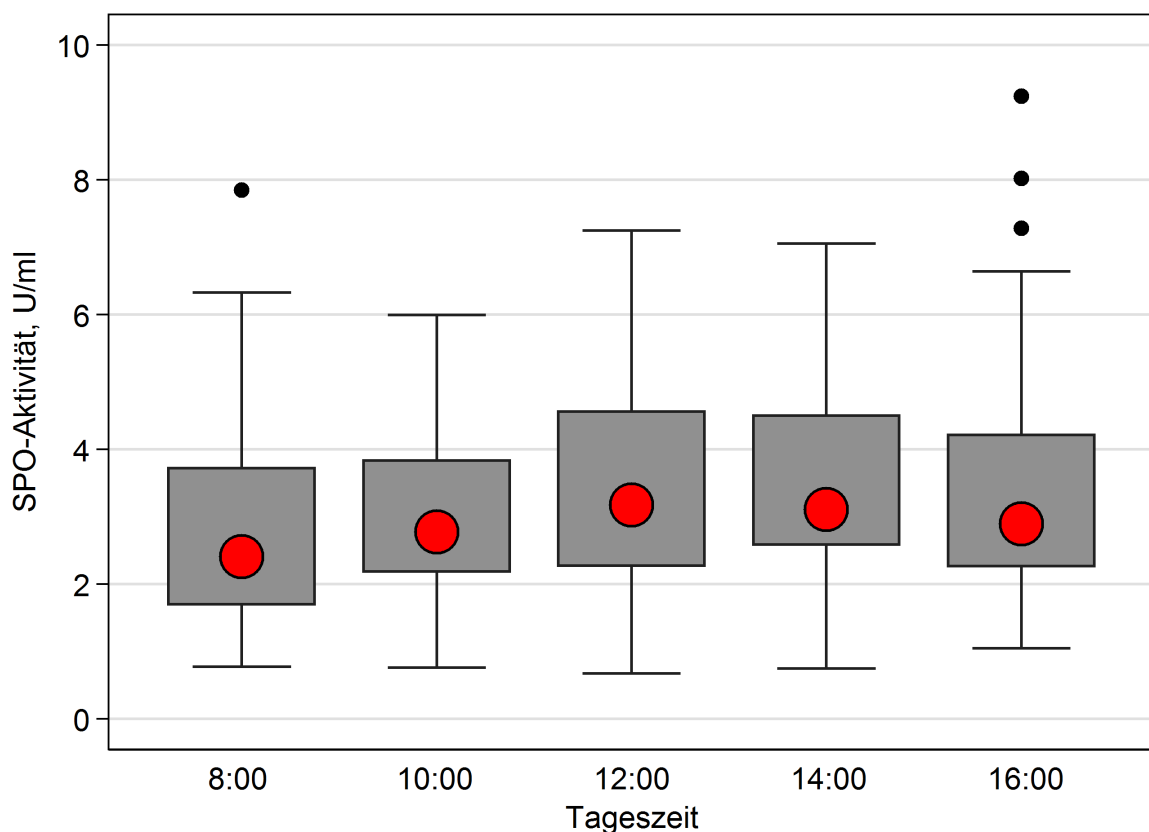


Abbildung 1: Box-Plot für Speichelperoxidase (SPO)-Aktivität nach Tageszeit

3.3 Speichelperoxidase und Sondierungstiefe

Die Assoziation zwischen SPO-Aktivität und Sondierungstiefe wurde in sechs Modellen dargestellt (Tab. 2). Abbildung 2 zeigt die Wirkung der SPO-Aktivität auf Sondierungstiefe für ausgewählte Modelle. Nach der Adjustierung nach SPO-Konzentration wurde die Assoziation zwischen SPO-Aktivität und Sondierungstiefe um weniger als 5% abgeschwächt. Bei zusätzlicher Adjustierung nach QHI wurde der Effekt des Interquartilsabstands um mehr als 15% reduziert, wobei das Konfidenzintervall schmaler wurde. Bei der Einbeziehung des Zahnfleischindex anstelle des QHI wurde der Effekt des Interquartilsabstands um etwa 40% reduziert. Allerdings war der Einfluss der SPO-Aktivität auf Sondierungstiefe noch groß (Tab. 2).

Tabelle 2: Veränderungen in der Sondierungstiefe, wenn sich die SPO-Aktivität von dem 1. Quartil (2,4 U / ml) auf das 3. Quartil (4,1 U / ml) ändert.

	Risikofaktoranalyse				Mediationsanalyse	
	Modell 1	Modell 2	Modell 3	Modell 4	Modell 5A	Modell 5B
Ohne Gewichte						
IQR-Effekt	-0,64	-0,66	-0,60	-0,59	-0,48	-0,35
95% CI*	-0,98; -0,35	-0,99; -0,36	-0,91; -0,32	-0,90; -0,31	-0,72; -0,23	-0,53; -0,14
P-Wert	0,0002	0,0001	0,0003	0,0004	0,0006	0,0033
Mit Gewichten						
IQR-Effekt	-0,48	-0,48	-0,48	-0,48	-0,42	-0,28
95% CI*	-0,98; -0,36	-1,00; -0,36	-0,93; -0,33	-0,90; -0,31	-0,72; -0,24	-0,53; -0,14
P-Wert	0,0081	0,0128	0,0060	0,0052	0,0024	0,0220

* 95% CI des IQR-Effekts

IQR: Interquartilsabstand, CI: Konfidenzintervall

Generalisiertes lineares Modell mit der Gamma-Verteilung und der Identität als Linkfunktion; Robuste Kovarianzmatrix-Schätzungen auf der Basis von 10.000 Bootstrapping-Stichproben.

Modell 1: nicht adjustiert

Modell 2: adjustiert nach Alter und Geschlecht.

Modell 3: adjustiert nach Alter, Geschlecht und Schulbildung.

Modell 4: adjustiert nach Alter, Geschlecht, Schulbildung und SPO-Konzentration.

Modell 5A: adjustiert nach Alter, Geschlecht, Schulbildung, SPO-Konzentration und Quigley-Hein Plaque-Index.

Modell 5B: adjustiert nach Alter, Geschlecht, Schulbildung, SPO-Konzentration und Gingiva-Index.

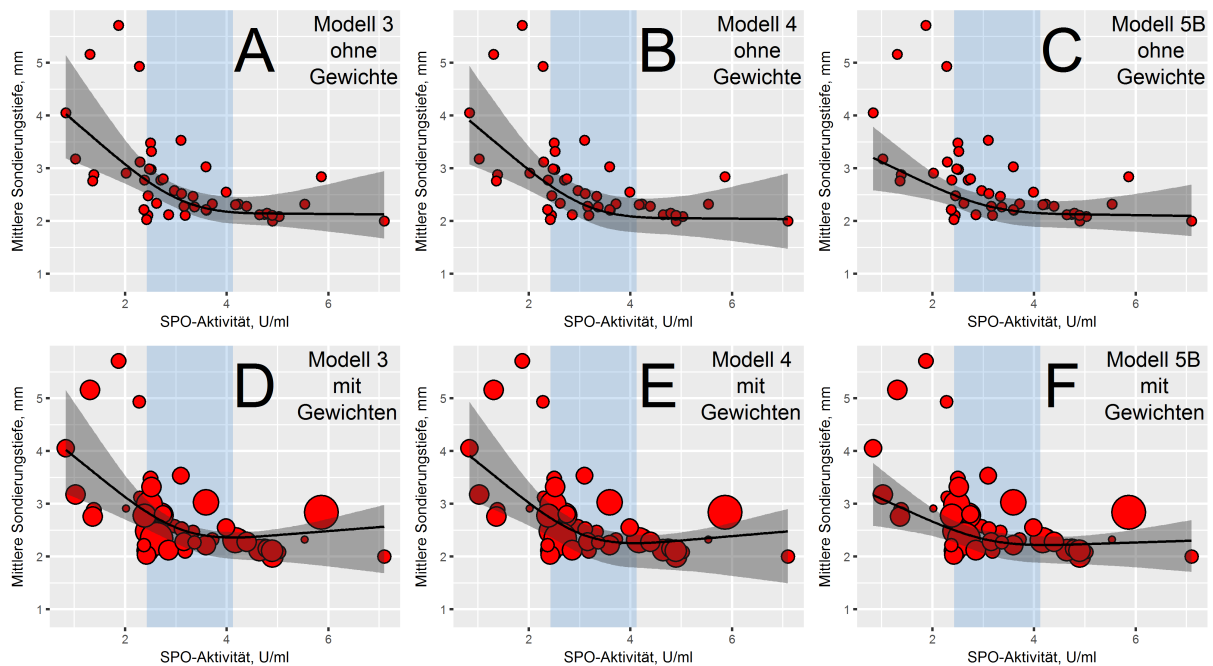


Abbildung 2: Zusammenhang zwischen SPO-Aktivität und Sondierungstiefe adjustiert nach Alter, Geschlecht und Schulbildung (A, D); nach Alter, Geschlecht, Schulbildung und SPO-Konzentration (B, E); und nach Alter, Geschlecht, Schulbildung, SPO-Konzentration und Zahnfleischindex (C, F); in Modellen ohne Gewichte (A-C) und mit Gewichten zur Korrektur des Selektionsbias (D-F). Die Größe des Kreises ist proportional zum Gewicht. Blau: Interquartilsabstand der SPO-Aktivität, Grau: 95% Konfidenzintervall. Hier sind die robusten (Bootstrapping-) 95%-Konfidenzintervalle, wie sie in der Tabelle 2 präsentiert wurden, auch abgebildet. Solche Konfidenzintervalle können asymmetrisch sein.

Die Wirkung der SPO-Konzentration auf Sondierungstiefe war je nach Modell und Gewichtung mäßig bis groß, aber statistisch nicht signifikant (Tabelle 3, Abb. 3). Der Effekt des Interquartilsabstands wurde um mehr als 20% nach Adjustierung nach der SPO-Aktivität reduziert (Tabelle 3). Bei zusätzlicher Adjustierung nach QHI oder dem Zahnfleischindex sank der Effekt des Interquartilsabstands um mehr als 40%. Wie stets kann aber deshalb ein Effekt der SPO-Konzentration nicht ausgeschlossen werden [47], zumal es in zusätzlichen Analysen (Abb. 4) Hinweise auf eine vermutete Interaktion von SPO-Konzentration und SPO-Aktivität auf die Sondierungstiefe gab ($p = 0,0256$).

Tabelle 3: Veränderungen in der Sondierungstiefe, wenn sich die SPO-Konzentration von dem 1. Quartil (8,7 ng/ml) auf das 3. Quartil (19,2 ng/ml) ändert.

	Risikofaktoranalyse				Mediationsanalyse	
	Modell 1	Modell 2	Modell 3	Modell 4	Modell 5A	Modell 5B
Ohne Gewichte						
IQR-Effekt	-0,23	-0,44	-0,40	-0,29	-0,16	-0,14
95% CI*	-0,72; 0,30	-0,94; 0,08	-0,91; 0,06	-0,67; -0,03	-0,41; 0,04	-0,35; 0,02
P-Wert	0,6042	0,1847	0,0851	0,2042	0,3217	0,3015
Mit Gewichten						
IQR-Effekt	-0,13	-0,29	-0,27	-0,21	-0,11	-0,11
95% CI*	-0,72; 0,30	-0,93; 0,09	-0,89; 0,06	-0,68; -0,03	-0,41; 0,04	-0,41; 0,03
P-Wert	0,8250	0,4068	0,2282	0,4052	0,6277	0,6187

* 95% CI des IQR-Effekts

IQR: Interquartilsabstand, CI: Konfidenzintervall

Generalisiertes lineares Modell mit der Gamma-Verteilung und der Identität als Linkfunktion; Robuste Kovarianzmatrix-Schätzungen auf der Basis von 10.000 Bootstrapping-Stichproben.

Modell 1: nicht adjustiert

Modell 2: adjustiert nach Alter und Geschlecht.

Modell 3: adjustiert nach Alter, Geschlecht und Schulbildung.

Modell 4: adjustiert nach Alter, Geschlecht, Schulbildung und SPO-Aktivität.

Modell 5A: adjustiert nach Alter, Geschlecht, Schulbildung, SPO-Aktivität und Quigley-Hein Plaque-Index.

Modell 5B: adjustiert nach Alter, Geschlecht, Schulbildung, SPO-Aktivität und Gingiva-Index.

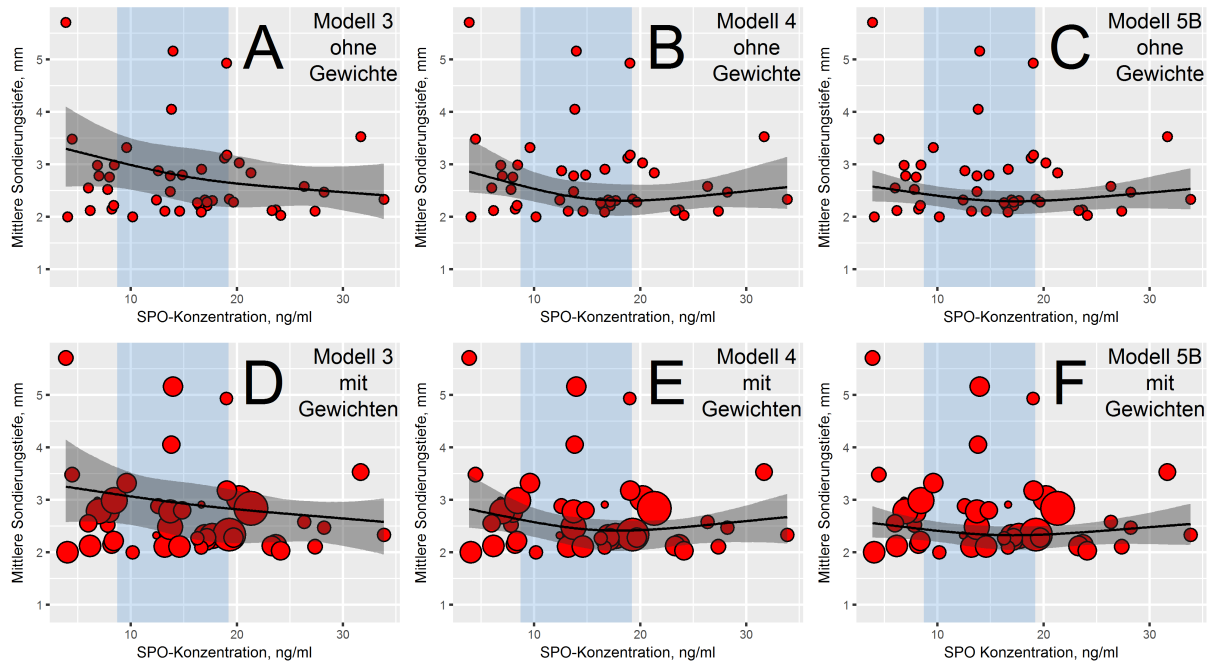


Abbildung 3: Zusammenhang zwischen SPO-Konzentration und Sondierungstiefe adjustiert nach Alter, Geschlecht und Schulbildung (A, D); nach Alter, Geschlecht, Schulbildung und SPO-Aktivität (B, E); Und nach Alter, Geschlecht, Schulbildung, SPO-Aktivität und Zahnfleischindex (C, F); in Modellen ohne Gewichte (A-C) und mit Gewichten zur Korrektur des Selektionsbias (D-F). Die Größe des Kreises ist proportional zum Gewicht. Blau: Interquartilsabstand der SPO-Konzentration, Grau: 95% Konfidenzintervall. Hier sind die robusten (Bootstrapping-) 95%-Konfidenzintervalle, wie sie in der Tabelle 3 präsentiert wurden, auch abgebildet. Solche Konfidenzintervalle können asymmetrisch sein.

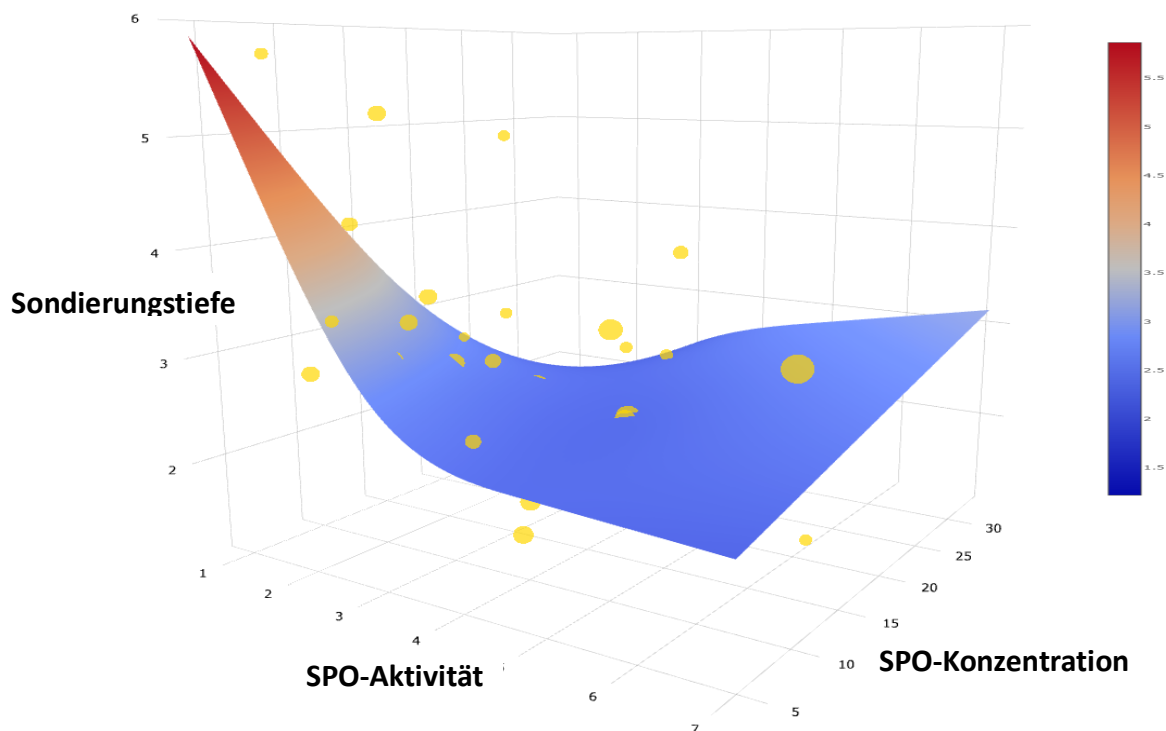


Abbildung 4: Interaktion von SPO-Aktivität und -Konzentration auf die Sondierungstiefe adjustiert nach Alter, Geschlecht und Schulbildung sowie mit Gewichtung

Da die konventionelle Analyse die Abwesenheit von Messfehlern, Selektionsbias und Confounding [50] voraussetzt, wurde das Ausmaß diese Arten von Bias in geeigneten Modellen analysiert. So konnte nach einer umfangreichen Simulationsstudie mit Hilfe von SHIP-TREND-Daten gezeigt werden, dass der Selektionsbias aufgrund fehlender Probanden mit weniger als 24 Zähnen klein ist.

Um die Stärke der Assoziation zwischen SPO-Aktivität und Sondierungstiefe im Vergleich zum Effekt des Rauchens interpretieren zu können, wurden SHIP-TREND-Daten von Probanden im Alter von 25-54 Jahren derselben Region wie die Probandenstichprobe verwendet. Raucher von ≥ 15 Zigaretten pro Tag hatten 0,42 mm tiefere Taschen (95% Konfidenzintervall: 0,35 – 0,50) als Personen, die nie geraucht hatten (adjustiert nach Alter, Geschlecht, Schulbildung und Diabetes mellitus). Somit war der IQR-Effekt der SPO-Aktivität etwas größer als der des schweren Rauchens.

3.4 Speichelperoxidase und Attachmentverlust

Die Assoziation zwischen SPO-Aktivität und Attachmentverlust wurde so wie bei der Sondierungstiefe in sechs Modellen dargestellt (Tab. 4). Abbildung 5 zeigt die Wirkung der SPO-Aktivität auf Attachmentverlust für ausgewählte Modelle. Attachmentverlust zeigte ähnliche Ergebnisse wie die Sondierungstiefe.

Tabelle 4: Veränderungen des Attachmentverlusts, wenn sich die SPO-Aktivität von dem 1. Quartil (2,4 U/ml) auf das 3. Quartil (4,1 U/ml) ändert.

	Risikofaktoranalyse				Mediationsanalyse	
	Modell 1	Modell 2	Modell 3	Modell 4	Modell 5A	Modell 5B
Ohne Gewichte						
IQR-Effekt	-0,70	-0,74	-0,67	-0,66	-0,54	-0,38
95% CI*	-1,11; -0,35	-1,16; -0,36	-1,06; -0,32	-1,03; -0,32	-0,83; -0,19	-0,67; -0,05
P-Wert	0,0012	0,0011	0,0017	0,0011	0,0019	0,0656
Mit Gewichten						
IQR-Effekt	-0,48	-0,53	-0,53	-0,54	-0,47	-0,31
95% CI*	-1,12; -0,34	-1,16; -0,36	-1,07; -0,32	-1,03; -0,32	-0,83; -0,20	-0,68; -0,05
P-Wert	0,0468	0,0399	0,0204	0,0116	0,0088	0,1663

* 95% CI des IQR-Effekts

IQR: Interquartilsabstand, CI: Konfidenzintervall

Generalisiertes lineares Modell mit der Gamma-Verteilung und der Identität als Linkfunktion; Robuste Kovarianzmatrix-Schätzungen auf der Basis von 10.000 Bootstrapping-Stichproben.

Modell 1: nicht adjustiert

Modell 2: adjustiert nach Alter und Geschlecht.

Modell 3: adjustiert nach Alter, Geschlecht und Schulbildung.

Modell 4: adjustiert nach Alter, Geschlecht, Schulbildung und SPO-Konzentration.

Modell 5A: adjustiert nach Alter, Geschlecht, Schulbildung, SPO-Konzentration und Quigley-Hein Plaque-Index.

Modell 5B: adjustiert nach Alter, Geschlecht, Schulbildung, SPO-Konzentration und Gingiva-Index.

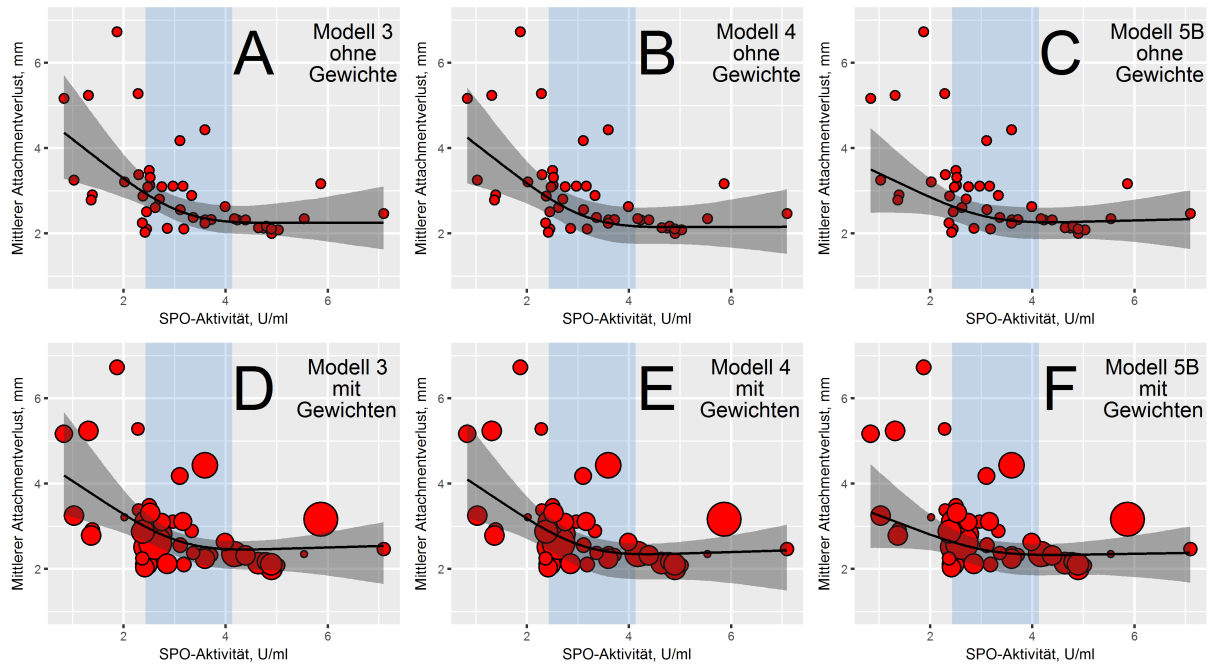


Abbildung 5: Zusammenhang zwischen SPO-Aktivität und Attachmentverlust adjustiert nach Alter, Geschlecht und Schulbildung (A, D); nach Alter, Geschlecht, Schulbildung und SPO-Konzentration (B, E); Und nach Alter, Geschlecht, Schulbildung, SPO-Konzentration und Zahnfleischindex (C, F); in Modellen ohne Gewichte (A-C) und mit Gewichten zur Korrektur des Selektionsbias (D-F). Die Größe des Kreises ist proportional zum Gewicht. Blau: Interquartilsabstand der SPO-Aktivität, Grau: 95% Konfidenzintervall. Hier sind die robusten (Bootstrapping-) 95%-Konfidenzintervalle, wie sie in der Tabelle 4 präsentiert wurden, auch abgebildet. Solche Konfidenzintervalle können asymmetrisch sein.

Die Wirkung der SPO-Konzentration auf Attachmentverlust war, ähnlich wie bei der Sondierungstiefe, je nach Modell und Gewichtung mäßig bis groß, aber statistisch nicht signifikant (Tabelle 5, Abb. 6).

Tabelle 5: Veränderungen des Attachmentverlusts, wenn sich die SPO-Konzentration von dem 1. Quartil (8,7 ng/ml) auf das 3. Quartil (19,2 ng/ml) ändert.

	Risikofaktoranalyse				Mediationsanalyse	
	Modell 1	Modell 2	Modell 3	Modell 4	Modell 5A	Modell 5B
Ohne Gewichte						
IQR-Effekt	-0,16	-0,52	-0,43	-0,29	-0,12	-0,10
95% CI*	-0,77; 0,48	-1,14; 0,13	-1,07; 0,12	-0,78; 0,05	-0,44; 0,13	-0,39; 0,12
P-Wert	0,8781	0,2921	0,2443	0,3306	0,7126	0,4425
Mit Gewichten						
IQR-Effekt	0,02	-0,31	-0,27	-0,19	-0,05	-0,06
95% CI*	-0,78; 0,49	-1,15; 0,13	-1,08; 0,12	-0,79; 0,05	-0,43; 0,13	-0,39; 0,13
P-Wert	0,9970	0,6145	0,5377	0,5228	0,9104	0,5639

* 95% CI des IQR-Effekts

IQR: Interquartilsabstand, CI: Konfidenzintervall

Generalisiertes lineares Modell mit der Gamma-Verteilung und der Identität als Linkfunktion; Robuste Kovarianzmatrix-Schätzungen auf der Basis von 10.000 Bootstrapping-Stichproben.

Modell 1: nicht adjustiert

Modell 2: adjustiert nach Alter und Geschlecht.

Modell 3: adjustiert nach Alter, Geschlecht und Schulbildung.

Modell 4: adjustiert nach Alter, Geschlecht, Schulbildung und SPO-Aktivität.

Modell 5A: adjustiert nach Alter, Geschlecht, Schulbildung, SPO-Aktivität und Quigley-Hein Plaque-Index.

Modell 5B: adjustiert nach Alter, Geschlecht, Schulbildung, SPO-Aktivität und Gingiva-Index.

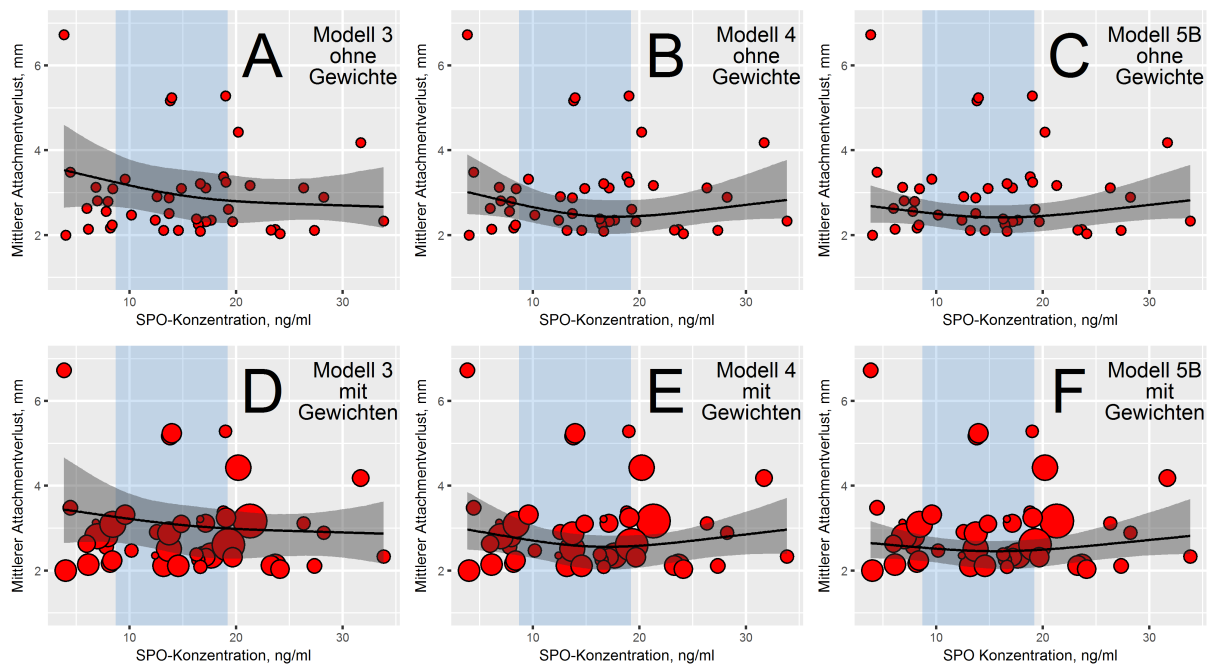


Abbildung 6: Zusammenhang zwischen SPO-Konzentration und Attachmentverlust adjustiert nach Alter, Geschlecht und Schulbildung (A, D); nach Alter, Geschlecht, Schulbildung und SPO-Aktivität (B, E); Und nach Alter, Geschlecht, Schulbildung, SPO-Aktivität und Zahnfleischindex (C, F); in Modellen ohne Gewichte (A-C) und mit Gewichten zur Korrektur des Selektionsbias (D-F). Die Größe des Kreises ist proportional zum Gewicht. Blau: Interquartilsabstand der SPO-Konzentration, Grau: 95% Konfidenzintervall. Hier sind die robusten (Bootstrapping-) 95%-Konfidenzintervalle, wie sie in der Tabelle 5 präsentiert wurden, auch abgebildet. Solche Konfidenzintervalle können asymmetrisch sein.

Um die Stärke der Assoziation zwischen SPO-Aktivität und Attachmentverlust im Vergleich zum Effekt des Rauchens interpretieren zu können, wurden SHIP-TREND-Daten, wie bei der Sondierungstiefe, verwendet.

Raucher von ≥ 15 Zigaretten pro Tag hatten 0,62 mm mehr Attachmentverlust (95% Konfidenzintervall: 0,47 – 0,77) als Personen, die nie geraucht hatten (adjustiert nach Alter, Geschlecht, Schulbildung und Diabetes mellitus). Somit war der IQR-Effekt der SPO-Aktivität etwas geringer als der des schweren Rauchens, aber deutlich größer als der des Rauchens von 1-14 pro Tag Zigaretten (0,25 mm; 95% CI: 0,13 – 0,37), legt man Modell 4 mit Gewichtung zugrunde.

4 Diskussion

Das menschliche Speichelperoxidase-System leistet wichtige Beiträge zur Mundgesundheit. So wirkt die SPS antimikrobiell und inaktiviert viele karzinogene bzw. mutagene Substanzen in der Mundhöhle. Das Ziel der vorliegenden Arbeit bestand darin, die Assoziation zwischen parodontaler Gesundheit und SPO-Enzymen zu untersuchen.

Die Ergebnisse zeigten eine starke Assoziation der SPO-Aktivität mit Sondierungstiefe und Attachmentverlust in einer Stichprobe von gesunden Nichtrauchern im Alter von 25-54 Jahren.

Für SPO-Aktivitätsmessungen wurde die valide *p*-Phenylendiamin-Methode [33] eingesetzt. Bei der Verwendung anderer Methoden, z. B. bei den häufiger verwendeten photometrischen Analysemethoden, kann die Bestimmung der SPO-Aktivität durch Thiocyanat-Ionen (SCN^-), die eine wesentliche Komponente des Speichels sind, gestört werden. Die mit diesen Methoden erhaltenen Aktivitätswerte sind daher fragwürdig [51]. Neben der validen *p*-Phenylendiamin-Methode ist es wichtig, die SPO-Aktivität von anderen OPO-Aktivitäten zu unterscheiden. Invalide SPO-Messungen der Aktivität können es verhindern, dass Assoziationen zwischen der SPO-Aktivität und der Mundgesundheit nachgewiesen werden.

Die Reliabilität einer einzigen SPO-Messung ist gut und die von fünf Messungen ist hervorragend [52]. Für eine ICC von mindestens 0,85 (das ist Standard in epidemiologischen Studien), sind drei SPO-Messungen erforderlich oder man benötigt – bei Verwendung von Messfehlermodellen – eine SPO-Messung und die ICC der vorliegenden Studie. Basierend auf den aktuellen Ergebnissen sind die Probennahmen um 10:00 Uhr, 12:00 Uhr und 14:00 Uhr zu empfehlen.

Das konkrete Ziel in der vorliegenden Studie war, mögliche präventive Effekte der SPO-Aktivität und -Konzentration auf die Sondierungstiefe abzuschätzen. Um präventive Effekte zu untersuchen, wurde eine primär nicht-klinische Stichprobe gewählt und der Schwerpunkt auf die Mehrheit der flachen Taschen gelegt. Durch Adaption von Roses Theorie der Präventivmedizin – einschließlich des subklinischen Krankheitsrahmens [35] – an Parodontalerkrankungen, haben Demmer et al. (2008) gezeigt, dass die ätiologische Belastung (*A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, *T. denticola*, *T. forsythia*) in der allgemeinen Bevölkerung vorwiegend aus Parodontaltaschen ≤ 3 mm kommt [53]. Es wurde hier aber die mittlere

Sondierungstiefe bevorzugt, weil sie einen guten Kompromiss zwischen epidemiologischen, statistischen und klinischen Konzepten bietet. Der Mittelwert verringert nicht nur den Verlust von Informationen, sondern spiegelt auch tiefe Taschen und damit auch klinische Aspekte wider. Der Kompromiss zwischen epidemiologischen, statistischen und klinischen Eigenschaften war erfolgreich, weil die mittlere Sondierungstiefe stark mit dem Anteil der Taschen ≥ 3 mm korreliert (Spearman-Korrelation = 0,94).

Das Minimum von 24 Zähnen in dieser Studie sichert valide Zielgrößen (mittlere Sondierungstiefe; mittlerer Attachmentverlust), was für die konkrete Fragestellung [54], nämlich ob SPO umgekehrt mit *subklinischer* parodontalen Erkrankung assoziiert ist, von größter Bedeutung ist. Allerdings war die Validität der Zielgrößen nur mit einem Selektionsbias auf Probandenebene sicherzustellen; dieser Selektionsbias wurde sowohl für Patienten mit 24-28 Zähnen als auch für Patienten mit weniger als 24 Zähnen korrigiert, indem Daten aus einer bevölkerungsrepräsentativen Studie verwendet wurden.

Die SPO-Konzentration konnte die Assoziation zwischen SPO-Aktivität und Sondierungstiefe nicht verringern, aber umgekehrt wurde die Assoziation zwischen der SPO-Konzentration und Sondierungstiefe durch die SPO-Aktivität abgeschwächt. Eine Wechselwirkung zwischen SPO-Aktivität und Konzentration, so dass niedrigere Aktivität in Kombination mit niedriger Konzentration einen zusätzlichen Effekt auf die Zielgröße bewirkt, ist plausibel, aber ihre genaue Schätzung erfordert eine große Stichprobengröße. Die einzige Studie, die eine Assoziation zwischen SPO-Aktivität und Sondierungstiefe (genauer gesagt juvenile Parodontitis) berichtete, hatte die SPO-Konzentration nicht gemessen [31]. Dennoch stimmen ihre Erkenntnisse grundsätzlich mit unseren überein und unterstützen die Hypothese, dass die SPO-Aktivität in früheren Stadien der Parodontalerkrankung involviert ist. In einer Gruppe von 28 Patienten mit juveniler Parodontitis (JP) waren die Peroxidaseaktivitäten sowohl in Parotis als auch in Speichelproben deutlich niedriger als bei den Kontrollen. In der Studie von Rosin et al. (1999) wurde hingegen keine Assoziation zwischen SPO-Aktivität und Zahnfleischgesundheit in einer Stichprobe mit 140 Männern jünger als 30 Jahre gefunden [33]. Die Speichelproben wurden jedoch eingefroren und bis zu zwei Monate gelagert, was gemäß unseren umfangreichen Vorversuchen zu invaliden SPO-Messungen führen kann, so dass sich dadurch keine belastbaren Aussagen von dieser Studie ableiten lassen. Darüber hinaus ist

bei dieser Arbeit unklar, ob die SPO-Aktivität von der MPO-Aktivität unterschieden wurde. Somit kann nicht ausgeschlossen werden, dass die Bestimmung der SPO-Aktivität durch die aus dem Sulkus stammende MPO-Aktivität beeinflusst wurde.

Die Mediationsanalyse deutet auf den Zahnfleischindex und in geringerem Maße auf Plaque als mögliche Mediatoren zwischen SPO-Aktivität und Sondierungstiefe hin, obwohl die Mediationsanalyse durch Stichprobengröße und Studiendesign beschränkt ist. Leider war es nicht möglich, ätiologische, putative sowie gesundheitsbezogene Belastung von Plaque zu unterscheiden [53]. Die SPO-Aktivität kann die ätiologische Belastung hemmen und die gesundheitsbezogenen Bakterienarten unterstützen [32]. SPO ist in der Lage, selektiven Druck auf orale Pathogene zu setzen und das Wachstum von gesundheitsbezogenen oralen Spezies zu erleichtern, von denen bekannt ist, dass sie an der Bekämpfung der bakteriell induzierten Entzündung der parodontalen Gewebe beteiligt sind [55, 56]. Unabhängig von der eigentlichen SPO-Produktion in den Speicheldrüsen kann die SPO-Aktivität beeinflusst werden. Obwohl die Rolle des Alters und des Rauchens bereits untersucht wurde [57, 58], sind noch viele andere biologische Bedingungen zu berücksichtigen. Wenn jedoch ein genetisches Defizit, wie beim MPO-Enzym, für die in dieser Studie beobachteten interindividuelle Unterschiede in der SPO-Aktivität verantwortlich sein sollte [59], würde es sich hierbei um einen nicht-modifizierbaren Risikofaktor handeln. Vorausgesetzt, unsere Ergebnisse werden durch größere Studien wiederholt und die Wirkung der niedrigen SPO-Aktivität bleibt so stark wie die des schweren Rauchens, wie hier durch die Verwendung einer großen bevölkerungsrepräsentativen Studie geschätzt, könnte die frühzeitige Erkennung eines SPO-Defizits bei der Bereitstellung geeigneter Prävention und Behandlung helfen.

In dieser Studie waren die SPO-Messungen von Aktivität und Konzentration nicht nur valid, sondern auch reliabel, da wir fünf wiederholte Messungen modellierten. Eine weitere wichtige Stärke der vorliegenden Studie war es, nichtlineare Assoziationen zwischen Sondierungstiefe und SPO zuzulassen, weil Hintergrundwissen Bodeneffekte nahelegte.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass innerhalb der Limitationen dieser Studie eine robuste Assoziation zwischen der Aktivität der SPO und der Sondierungstiefe gefunden wurde. So bedeuten unsere Ergebnisse, dass die SPO-

Aktivität ein Schutzfaktor gegen Parodontitis sein könnte. Allerdings sind große, gut designte Studien erforderlich, um die kausalen Mechanismen der gezeigten Assoziation zu erforschen.

5 Zusammenfassung

Zu den unspezifisch wirkenden Abwehrsystemen des Speichels gehören die oralen Peroxidasen (OPO), vor allem die Speichel- (SPO) und Myeloperoxidase (MPO) sowie zu einem geringen Anteil die eosinophile Peroxidase (EPO). Letzteres spielt nur bei Parasitäre Infektionen, allergische Reaktionen und Asthma-Pathogenese eine Rolle [60]. Durch die Vermittlung der Speichelperoxidase wird Thiocyanat (SCN^-) zu dem antimikrobiell hoch wirksamen Hypothiocyanit (OSCN^-) oxidiert, wobei H_2O_2 als Sauerstoffdonator fungiert. Die antimikrobielle Wirkung des SPO- SCN^- - H_2O_2 -System (SPO-Systems) konnte in zahlreichen Studien belegt werden. Hingegen erbrachten die Studien zum Nachweis des daraus abgeleiteten potentiell protektiven Effektes des SPO-Systems auf die orale Gesundheit eher kontroverse Ergebnisse. Zu den Gründen für die unterschiedlichen Ergebnisse gehören vornehmlich die Komplexität des SPO-Systems und die fragliche Validität und Reliabilität sowohl der Nachweismethoden als auch der Aufnahme der untersuchten oralen Parameter.

Ziel der vorliegenden Studie war es, den Zusammenhang zwischen der parodontalen Gesundheit und dem SPO-Enzym mittels valider und reliabler Messungen zu untersuchen. Erstmals wurden nicht nur beide Enzymparameter (Aktivität, Konzentration) des Ruhespeichels bestimmt, sondern sie wurden auch jeweils fünfmal am gleichen Tag – im Abstand von zwei Stunden – erhoben, um so den Einfluss des SPO-Enzyms auf die parodontale Gesundheit reliabel evaluieren zu können. Die valide Bestimmung der SPO-Aktivität ergab sich aus der Differenz der OPO-Aktivität und der MPO-Aktivität, die nach dem Zusatz des SPO-Inhibitors Dapson jeweils durch die SCN^- -störungsfreie *p*-Phenylendiamin-Methode ermittelt wurden. Die SPO-Konzentration wurde mittels des ELISA-Verfahrens (USCN, Life Science Inc.) bestimmt.

Eine zahnmedizinische Untersuchung des gesamten Gebisses wurde an einer Stichprobe von 46 25-54-jährigen Nichtrauchern ohne Diabetes mellitus durchgeführt. Aufgrund des hohen Anteils an Vollbezahnten wurden diese Daten anhand der Daten einer bevölkerungsrepräsentativen Studie der gleichen Zielpopulation (SHIP-TREND) im Hinblick auf die Anzahl an Zähnen korrigiert. SHIP-TREND-Daten ermöglichten es auch, die Effektstärke des SPO-Enzyms in der vorliegenden Studie mit der des Rauchens zu vergleichen.

Die SPO-Aktivität war mit der Sondierungstiefe (Effektstärke: -0,48 mm; robustes 95% Konfidenzintervall: -0,90 – -0,31 mm; $p = 0,0052$) und dem Attachmentverlust assoziiert (Effektstärke: -0,54 mm; robustes 95% Konfidenzintervall: -1,03 – -0,32 mm; $p = 0,0116$). In SHIP-TREND wiesen starke Raucher (≥ 15 Zigaretten pro Tag) 0,42 mm mehr Sondierungstiefe (95% Konfidenzintervall: 0,35 – 0,50) und 0,62 mm mehr Attachmentverlust (95% Konfidenzintervall: 0,47 – 0,77 mm) auf als Personen, die nie geraucht hatten. Somit lag die Effektstärke der SPO-Aktivität bei der Sondierungstiefe etwas über, beim Attachmentverlust etwas unter dem Effekt des starken Rauchens.

Die Effektstärke der SPO-Konzentration war geringer als die der SPO-Aktivität und statistisch nicht signifikant. Wie stets kann aber deshalb ein Effekt der SPO-Konzentration nicht ausgeschlossen werden, zumal es in zusätzlichen Analysen Hinweise auf eine vermutete Interaktion von SPO-Konzentration und SPO-Aktivität auf die Sondierungstiefe gab ($p = 0,0256$).

Die umgekehrte Assoziation der SPO-Aktivität mit Sondierungstiefe und Attachmentverlust unterstützt die Hypothese, dass die SPO-Aktivität ein Schutzfaktor gegen Parodontitis sein könnte. Große, gut designte Studien sind jedoch notwendig, um kausale Mechanismen dieser Assoziation zu untersuchen.

6 Literaturverzeichnis

1. Jordan AR, Micheelis W. Hrsg. Kernergebnisse aus der DMS V. In: Jordan AR, Micheelis W. Fünfte Deutsche Mundgesundheitsstudie DMS V. Köln: Deutscher Zahnärzte Verlag; 2016.
2. Wolff, L.F., et al., Natural distribution of 5 bacteria associated with periodontal disease. *J Clin Periodontol*, 1993. 20(10): 699-706.
3. Shenker, B.J., Immunologic dysfunction in the pathogenesis of periodontal diseases. *J Clin Periodontol*, 1987. 14(9): 489-498.
4. Oram, J.D. and B. Reiter, Inhibition of Streptococci by Lactoperoxidase Thiocyanate and Hydrogen Peroxide - Effect of Inhibitory System on Susceptible and Resistant Strains of Group N Streptococci. *Biochem J*, 1966. 100(2): 373-381.
5. Aune, T.M. and E.L. Thomas, Accumulation of hypothiocyanate ion during peroxidase-catalysed oxidation of thiocyanate ion. *Eur J Biochem*, 1977. 80: 209-214.
6. Paetzelt, H., A. Kramer, and K.-H. Lüdde, Die biologische Bedeutung der Lactoperoxidase-H₂O₂-Thiocyanatsysteme. *Wiss Z Ernst-Moritz-Arndt-Univ Greifswald, Med Reihe*, 1984. 33(2): 12-13.
7. Shin, K., M. Tomita, and B. Lonnerdal, Identification of lactoperoxidase in mature human milk. *J Nutr Biochem*, 2000. 11(2): 94-102.
8. Van Haeringen NJ, Ensink FTE, Glasius E: Peroxidase-thiocyanate-hydrogenperoxide system in tear fluid and saliva of different species. 1979; *Experimental Eye Research* 28: 343-347.
9. Gerson, C., et al., The lactoperoxidase system functions in bacterial clearance of airways. *Am J Resp Cell Mol Biol*, 2000. 22(6): 665-671.
10. Wijkstrom-Frei, C., et al., Lactoperoxidase and Human Airway Host Defense. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2003. 29(2): 206-212.
11. Wever, R., et al., The peroxidation of thiocyanate catalysed by myeloperoxidase and lactoperoxidase. *Biochim Biophys Acta*, 1982. 709(2): 212-219.
12. Cao, C.F. and Q.T. Smith, Crevicular fluid myeloperoxidase at healthy, gingivitis and periodontitis sites. *J Clin Periodontol*, 1989. 16(1): 17-20.
13. Thomas, E.L., et al., Leukocyte Myeloperoxidase and Salivary Lactoperoxidase - Identification and Quantitation in Human Mixed Saliva. *J Dent Res*, 1994. 73(2): 544-555.
14. Thomas, E.L., et al., Oxidation of Bromide by the Human-Leukocyte Enzymes Myeloperoxidase and Eosinophil Peroxidase - Formation of Bromamines. *J Biol Chem*, 1995. 270(7): 2906-2913.
15. Paetzelt, H. and K.-H. Lüdde, Zur Bedeutung von Myeloperoxidase und eosinophiler Peroxidase für die unspezifische Infektabwehr. *Wiss Z Ernst-Moritz-Arndt-Univ Greifswald, Med Reihe*, 1987. 36(3-4): 31-33.
16. Decker, H. and W. Weuffen, Thiocyanat - ein bioaktives Ion. 2004, Bad Saarow: Törpin. pp. 163-190
17. Schliephake, F., Mikrobizide und zytotoxische Funktionen polymorphkerniger Leukozyten bei Patienten mit Sepsis. 2006, Medizinische Fakultät, Ludwig-Maximilians-Universität München. p. 76.
18. Carlsson, J., Y. Iwami, and T. Yamada, Hydrogen peroxide excretion by oral streptococci and effect of Lactoperoxidase-thiocyanate-hydrogen peroxide. *Infect Immun*, 1983. 40: 70-80.

19. Thomas, E.L., et al., Antibacterial Activity of Hydrogen-Peroxide and the Lactoperoxidase-Hydrogen Peroxide-Thiocyanate System against Oral Streptococci. *Infect Immun*, 1994. 62(2): 529-535.
20. Pihlstrom, B.L., B.S. Michalowicz, and N.W. Johnson, Periodontal diseases. *Lancet*, 2005. 366(9499): 1809-1820.
21. Nibali, L. and N. Donos, Periodontitis and redox status: a review. *Curr Pharm Des*, 2013. 19(15): 2687-2697.
22. Wu, W., et al., Effect of vitamin C administration on hydrogen peroxide-induced cytotoxicity in periodontal ligament cells. *Mol Med Rep*, 2015. 11(1): 242-248.
23. Carlsson, J., Salivary Peroxidase - an Important Part of Our Defense against Oxygen-Toxicity. *J Oral Pathol Med*, 1987. 16(8): 412-416.
24. Kussendrager, K.D. and A.C. van Hooijdonk, Lactoperoxidase: physico-chemical properties, occurrence, mechanism of action and applications. *Br J Nutr*, 2000. 84 Suppl 1: 19-25.
25. Reiter, B. and G. Härnqvist, Lactoperoxidase antibacterial system: natural occurrence, biological functions and practical applications. *J Food Prot*, 1984. 47: 724-732.
26. Reiter, B. and J.P. Perraudin, Lactoperoxidase: biological functions, in *Peroxydases in Chemistry and Biology*. 1991, Boca Raton: CRC Press. pp. 143-180.
27. Ihalin, R., V. Loimaranta, and J. Tenonuo, Origin, structure, and biological activities of peroxidases in human saliva. *Arch Biochem Biophys*, 2006. 445(2): 261-268.
28. Marcaccini, A.M., et al., Gingival crevicular fluid levels of MMP-8, MMP-9, TIMP-2, and MPO decrease after periodontal therapy. *J Clin Periodontol*, 2010. 37(2): 180-190.
29. Dagar, M., et al., Effect of nonsurgical periodontal therapy on salivary myeloperoxidase levels: A biochemical study. *J Indian Soc Periodontol*, 2015. 19(5): 531-536.
30. Pruitt, K.M., et al., Limiting factors for the generation of hypothiocyanite ion, an antimicrobial agent, in human saliva. *Caries Res*, 1982. 16(4): 315-323.
31. Saxén, L., J. Tenonuo, and P. Vilja, Salivary defense mechanisms in juvenile periodontitis. *Acta Odontol Scand*, 1990. 48(6): 399-407.
32. Rudney, J.D., et al., Antimicrobial proteins in human unstimulated whole saliva in relation to each other, and to measures of health status, dental plaque accumulation and composition. *Arch Oral Biol*, 1991. 36(7): 497-506.
33. Rosin, M., et al., Activities of lysozyme and salivary peroxidase in unstimulated whole saliva in relation to plaque and gingivitis scores in healthy young males. *Clin Oral Investig*, 1999. 3(3): 133-137.
34. Shimizu, E., et al., Effects of orally administered lactoferrin and lactoperoxidase-containing tablets on clinical and bacteriological profiles in chronic periodontitis patients. *Int J Dent*, 2011. 2011: 405139.
35. Rose, G., *Rose's Strategy of Preventive Medicine 2008*, New York: Oxford University Press. pp. 41-63.
36. Demmer, R.T., et al., Refining exposure definitions for studies of periodontal disease and systemic disease associations. *Community Dent Oral Epidemiol*, 2008. 36(6): 493-502.
37. Turesky, S., N.D. Gilmore, and I. Glickman, Reduced plaque formation by the chloromethyl analogue of vitamin C. *J Periodontol*, 1970. 41(1): 41-43.

38. Quigley, G.A. and J.W. Hein, Comparative cleansing efficiency of manual and power brushing. *J Am Dent Assoc*, 1962. 65: 26-29.
39. Loe, H. and J. Silness, Periodontal disease in pregnancy. I. Prevalence and severity. *Acta Odontol Scand*, 1963. 21: 533-551.
40. WHO, :Oral health surveys. Basic methods. 1997 World Health Organization: Genf.
41. Thomas, E.L., et al., Leukocyte myeloperoxidase and salivary lactoperoxidase: identification and quantitation in human mixed saliva. *J Dent Res*, 1994. 73(2): 544-555.
42. Holtfreter, B., et al., Standards for reporting chronic periodontitis prevalence and severity in epidemiologic studies - Proposed standards from the Joint EU/USA Periodontal Epidemiology Working Group. *J Clin Periodontol*, 2015. 42(5): 407-412.
43. Hardin, J.W. and J. Hilbe, *Generalized Linear Models and Extensions*. 3rd ed. 2012, College Station: Stata Press. pp. 121-136.
44. Senn, S., *Statistical Issues in Drug Development*. 2nd ed. 2007, Chichester: John Wiley and Sons. pp. 59-60.
45. Salazar, M.G., et al., Identification of periodontitis associated changes in the proteome of whole human saliva by mass spectrometric analysis. *J Clin Periodontol*, 2013. 40(9): 825-832.
46. Gelman, A. and J. Carlin, Beyond Power Calculations: Assessing Type S (Sign) and Type M (Magnitude) Errors. *Perspect Psychol Sci*, 2014. 9(6): 641-651.
47. Wasserstein, R.L. and A.S. Assoc, ASA Statement on Statistical Significance and P-Values. *American Statistician*, 2016. 70(2): 131-133.
48. Völzke, H., et al., Cohort profile: the study of health in Pomerania. *Int J Epidemiol*, 2011. 40(2): 294-307.
49. Singer, J.D. and J.B. Willett, *Applied Longitudinal Data Analysis: Modeling Change and Event Occurrence*. 2003, New York: Oxford University Press. p. 53.
50. Greenland, S., Multiple-bias modelling for analysis of observational data. *Journal of the Royal Statistical Society Series A (Statistics in Society)*, 2005. 168: 267-291.
51. Mansson-Rahemtulla, B., et al., Specific Assays for Peroxidases in Human-Saliva. *Arch Oral Biol*, 1986. 31(10): 661-668.
52. Szklo, M. and F. Javier Nieto, *Epidemiology: Beyond the Basics*. 3rd ed. 2014, Boston: Jones and Bartlett Publishers. p. 340.
53. Demmer, R.T., et al., Bleeding on probing differentially relates to bacterial profiles: the Oral Infections and Vascular Disease Epidemiology Study. *J Clin Periodontol*, 2008. 35(6): 479-486.
54. Gelman, A. and J. Hill, *Data Analysis Using Regression and Multilevel/Hierarchical Models*. 2007, Cambridge: Cambridge University Press. p. 45.
55. Stingu, C.S., et al., Periodontitis is associated with a loss of colonization by *Streptococcus sanguinis*. *J Med Microbiol*, 2008. 57(Pt 4): 495-499.
56. Ashby, M.T., et al., Influence of a model human defensive peroxidase system on oral streptococcal antagonism. *Microbiology*, 2009. 155(Pt 11): 3691-3700.
57. Salvolini, E., et al., Age-related modifications in human unstimulated whole saliva: A biochemical study. *Aging (Milano)*, 2000. 12(6): 445-448.
58. Reznick, A.Z., et al., Inhibition of oral peroxidase activity by cigarette smoke: in vivo and in vitro studies. *Free Radic Biol Med*, 2003. 34(3): 377-384.

59. Erciyas, K., et al., Genetic variation of myeloperoxidase gene contributes to aggressive periodontitis: A preliminary association study in Turkish population. *Dis Markers*, 2010. 28(2): 95-99.
60. Rothenberg, M.E. and S.P. Hogan, The eosinophil. *Annu Rev Immunol*, 2006. 24: 147-174.

7 Anhang

7.1 Patientenaufklärung

Patienteninformation zum Forschungsvorhaben
--

Quantitäts- und Aktivitätsbestimmung von Parametern der oralen Peroxidasysteme in Korrelation zur Zahn-/Mundgesundheit im Rahmen des Projektes „Large Protection of Oral Health“ (V-630-S-137-2012/024 / V-630-F-137-2012/023)“

Untersuchungszentrale: Poliklinik für Zahnerhaltung, Parodontologie, Endodontologie, Präventive Zahnmedizin und Kinderzahnheilkunde im Zentrum für Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde der Universitätsmedizin Greifswald

Walther-Rathenau-Str. 42

17475 Greifswald

Ansprechpartner:

Projektleiter:

OA PD Dr. med. dent. Alexander Welk

Tel.: 03834/ 867169

E-Mail: welk@uni-greifswald.de

Prüfärztin:

ZÄ Maral Memarzadeh Zahedani

Tel.: 03834/ 867127

E-Mail: maral.zahedani@uni-greifswald.de

Sehr geehrte Patientin, sehr geehrter Patient,

wir laden Sie ein an o.g. Studie teilzunehmen. Bevor Sie sich entscheiden an dieser Studie teilzunehmen, möchten wir Ihnen noch ein paar Informationen zu der Studie geben.

Der Biofilm ist die wichtigste initiale Ursache für orale Erkrankungen, wie Karies, Gingivitis und Parodontitis. Daher ist es wichtig den dentalen Biofilm (die Plaque) mit seinen pathogenen Eigenschaften durch zweimal tägliches Zähneputzen zu entfernen.

Unser Ziel ist es, die Relevanz zwischen Zahn-Mundgesundheit und Speichelzusammensetzung zu untersuchen.

Um dieses Ziel zu erreichen, möchten wir bei Ihnen in einer klinischen Untersuchung Ihre Zahn-/Mundgesundheit feststellen und zu mehreren Zeitpunkten Speichelproben sammeln. In Ihren Speichelproben werden wir mittels verschiedener messtechnischer Verfahren die Lactoperoxidase-

System-relevanten Komponenten (LPO) analysieren. Unter dem Lactoperoxidase-System (LPO) versteht man die Kombination aus dem Enzym Lactoperoxidase und dessen ionischen Substraten, dem Wasserstoffperoxid sowie den Oxidationsprodukten. Bekannte Substrate sind Bromid- und Iodid-Ionen, aber auch das Thiocyanat-Ion. Die Produkte der enzymkatalysierten Oxidation sind stark antibakteriell wirksam. Die Auswertung der Ergebnisse zur Beurteilung der Relevanz zwischen Zahn-Mundgesundheit und LPO-System-Konzentrationen sind von großer Bedeutung.

1. Wie ist der Ablauf der Studie und was muss ich bei Teilnahme beachten?

Es wird 5-mal am Tag Speichelproben genommen. Sie dürfen 1 Stunde vor der Probenentnahme nichts essen oder trinken und die Zähne nicht putzen. Die erste Probenahme erfolgt um 08:00 Uhr morgens und wird alle 2 Stunden wiederholt. Es werden jedes mal 5 ml nichtstimulierten und 1 ml stimulierten Gesamtspeichel in der Zahnklinik der Universität Greifswald gesammelt.

Die 5 ml nichtstimulierten Speichelproben sind ausschließlich in den zur Verfügung gestellten Probengefäßen zu sammeln. Entleeren Sie alle 3-4 Minuten den im Mund angesammelten Speichel in das Probengefäß. Befüllen Sie das Probenröhrchen mit 5 ml Speichel und verschließen Sie mit der Kappe das Probengefäß gut.

Für 1 ml stimulierten Speichel werden die Salivetten (Salivetten®) verwendet, die aus einem Sammelgefäß, einem Einhängegefäß und einer Kunstfaserrolle bestehen.

Die Kunstfaserrolle entnehmen und etwa 1-2 Minuten im Mund kauen bis sie voll durchtränkt ist. Während des Speichelsammelns bitte nicht essen oder trinken! Die Watterolle zurück in das Einhängegefäß der Salivette geben. Die Proben werden danach sofort auf Eis gelegt und zur analytischen Untersuchung ins Labor des Instituts für Hygiene und Umweltmedizin Greifswald geschickt. Sie können selbst entscheiden, ob Sie in der zwischen Zeit nach Hause gehen oder in der Zahnklinik bleiben wollen.

Die Zahn-/Mundgesundheit wird durch eine klinische Untersuchung festgestellt.

Es heißt, den Mund weit aufzumachen, damit die Zähne genau überprüft werden. Zu diesem Zweck wird einen kleinen Spiegel verwendet, mit dessen Hilfe sich auch die Zahnrückseiten genau einsehen lassen.

Außerdem kommen dünne Sonden aus Metall zum Einsatz. Diese dienen dazu, die Härte des Zahnschmelzes zu überprüfen. Ebenfalls kontrolliert werden die Zahnbeläge. Dabei wird besonders darauf geachtet, ob diese noch weich sind, oder ob bereits harter Zahnstein entstanden ist. Neben den Zähnen wird natürlich auch das Zahnfleisch genau untersucht. Um festzustellen, ob eine Parodontitis vorliegt, kommt eine spezielle Parodontalsonde zum Einsatz. Dringt diese Sonde tief in die Zahnfleischtaschen vor, handelt es sich um eine fortgeschrittene Zahnfleischartzündung, denn entzündete Zahntaschen sind tiefer als gesunde Taschen. Außerdem bluten sie bereits bei leichten Berührungen.

2. Welche Risiken sind mit der Teilnahme an der Studie verbunden?

Die Entnahme einer Speichelprobe ist mit keinem Risiko verbunden. Weitere Risiken sind mit der Teilnahme an der Studie für Sie nicht verbunden. Ihre ärztliche Versorgung bleibt durch die Teilnahme völlig unbeeinflusst.

Sie werden im Rahmen der klinischen Untersuchungen über die medizinische Fakultät abgesichert sein. Für die Wege von und zur Zahnklinik ist eine Wegeunfallversicherung Bei der SV-Sparkassenversicherung Gebäudeversicherung AG (Löwentorstraße 65, 70376 Stuttgart; Tel.: 0711 898 100; Fax: 0711 898 109; Email: service@sparkassenversicherung.de) abgeschlossen. Die Versicherungsschein-Nummer lautet 50 050 924/238.

3. Wer darf an dieser Studie nicht teilnehmen?

Sie dürfen an dieser Studie nicht teilnehmen, falls Sie eine oder mehrere der folgenden Kriterien erfüllen:

- Systemische Krankheiten oder Medikamenteneinnahme in den letzten 6 Monaten, die die PMN- und/oder Speicheldrüsen-Funktion und die Speichel- und Sulkusflüssigkeitszusammensetzung beeinflussen würden, wie z. B. Mundtrockenheit durch Medikamente gegen Asthma oder Schlafmittel, Bestrahlungstherapien im Bereich der Speicheldrüsen oder Chirurgische Eingriffe im Bereich der Speicheldrüse oder Erkrankungen der Speicheldrüsen wie Sjögren-Syndrom oder Begleitscheinungen bei bestimmten Krankheiten (Diabetes, Morbus Parkinson, Depression). Die Prüffärztin wird es mit Ihnen genauer besprechen.
- Parodontitisbehandlung in den letzten 6 Monaten.
- Schwangerschaft / Einnahme von Kontrazeptiva
- Gleichzeitige Teilnahme an einer anderen klinischen Prüfung
- Raucher, Alkohol-, Medikamenten- oder Drogenabhängige
- Einnahme von Antibiotika / NSAIDs
- Tägliche Verwendung von oralen Antiseptika

4. Entstehen für mich Kosten durch die Teilnahme an der Studie? Erhalte ich eine Aufwandsentschädigung?

Die Teilnahme an dieser Studie ist Für Sie mit keinen Kosten verbunden. Für Ihre Teilnahme erhalten Sie eine Aufwandsentschädigung in Höhe von 50,00 Euro.

5. Kann meine Teilnahme an der Studie vorzeitig beendet werden?

Sie können jederzeit, auch ohne Angabe von Gründen, Ihre Teilnahme an der Studie beenden, ohne dass Ihnen dadurch irgendwelche Nachteile entstehen. Wenn Sie Ihre Zustimmung zur Teilnahme an der

Studie vor Beendigung oder auch nach Beendigung der Studie zurückziehen wollen, kontaktieren Sie bitte mündlich oder schriftlich die oben genannten Ansprechpartner.

6. Was geschieht mit meinen Daten? Was geschieht mit meinen Proben?

Ihre Speichelproben werden in pseudonymisierter Form in das Institut für Hygiene und Umweltmedizin Greifswald zur Messung der LPO-Komponenten geschickt. Pseudonymisiert bedeutet, dass keine Angaben von Namen oder Initialen verwendet werden, sondern nur ein Nummern- und/oder Buchstabencode. Ein Rückschluss auf Ihre Person ist nur über Ihren Arzt möglich. Dieser unterliegt aber der ärztlichen Schweigepflicht und darf Ihre Identität nicht preisgeben. Nach Abschluss der Untersuchung werden Ihre Proben vernichtet. Ihre klinischen Daten werden in pseudonymisierter Form im Prüfbüro gespeichert und ausgewertet. Anschließend sollen diese Daten in anonymisierter Form (d.h. ohne, dass ein Rückschluss auf Ihre Person möglich ist) in Fachzeitschriften veröffentlicht bzw. auf Fachtagungen vorgestellt werden. Einzelheiten zu Ihrer Einwilligung und zur Datenerhebung, insbesondere zur Möglichkeit eines Widerrufs, entnehmen Sie bitte der Einwilligungserklärung, die im Anschluss an diese Patienteninformation abgedruckt ist.

7. An wen wende ich mich bei weiteren Fragen?

Sollten Sie weitere Fragen haben, haben Sie stets die Gelegenheit mit einem der auf Seite 1 genannten Ansprechpartner in Kontakt zu treten.

7.2 Patienteneinwilligung

Titel der Studie:

Quantitäts- und Aktivitätsbestimmung von Parametern der oralen Peroxidasysteme in Korrelation zur Zahn-/Mundgesundheit im Rahmen des Projektes „Large Protection of Oral Health“ (V-630-S-137-2012/024 / V-630-F-137-2012/023)“

Untersuchungszentrale: Poliklinik für Zahnerhaltung, Parodontologie, Endodontologie, Präventive Zahnmedizin und Kinderzahnheilkunde im Zentrum für Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde der Universitätsmedizin Greifswald

Walther-Rathenau-Str. 42

17475 Greifswald

Ansprechpartner:

Projektleiter:

OA PD Dr. med. dent. Alexander Welk

Tel.: 03834/867169

E-Mail: welk@uni-greifswald.de

Prüfärztin:

ZÄ Maral Memarzadeh Zahedani

Tel.: 03834/ 867127

E-Mail: maral.zahedani@uni-greifswald.de

Einwilligungserklärung

Ich bin in einem persönlichen Gespräch durch den Prüfarzt ausführlich und verständlich über Wesen, Bedeutung, Ablauf, Risiken und Tragweite der Studie aufgeklärt worden.

Ich habe eine Kopie der Patienteninformation und Einwilligungserklärung ausgehändigt bekommen, diese gelesen und verstanden.

Ich hatte die Gelegenheit, mit dem Prüfarzt über die Durchführung der Studie zu sprechen. Alle meine Fragen wurden zufrieden stellend beantwortet.

Möglichkeit zur Dokumentation zusätzlicher Fragen seitens der Patientin/des Patienten oder sonstiger Aspekte des Aufklärungsgesprächs:

Ich hatte ausreichend Zeit, um meine Entscheidung zu überdenken und frei zu treffen.

Ich bin damit einverstanden, dass die in der Untersuchung erhobenen Daten und Proben in pseudonymisierter Form (d.h. alle persönlichen Daten wie z. B. Name, Geburtstag, Anschrift werden durch eine Studiennummer ersetzt) gespeichert, ausgewertet und veröffentlicht werden.

Ich bin darüber aufgeklärt worden, dass die Teilnahme an der Prüfung freiwillig erfolgt und ich jederzeit auch ohne Angabe von Gründen meine Teilnahme an der Studie beenden kann, ohne dass mir daraus Nachteile entstehen.

Ich bin damit einverstanden, dass ich keine Rückinformationen über die Ergebnisse der Studie erhalte.

Ich bin mir bewusst, keinerlei Ansprüche auf Vergütung, Tantieme oder sonstige Beteiligung an finanziellen Vorteilen und Gewinnen zu haben, die möglicherweise auf der Basis der Forschung erlangt werden.

Datenschutz:

Mir ist bekannt, dass bei dieser Studie personenbezogene Daten über mich erhoben, gespeichert und ausgewertet werden sollen. Die Verwendung der Daten erfolgt nach gesetzlichen Bestimmungen und setzt vor der Teilnahme an der Studie folgende freiwillig abgegebene Einwilligungserklärung voraus, das heißt ohne die nachfolgende Einwilligung kann ich nicht an der Studie teilnehmen.

1. Ich erkläre mich damit einverstanden, dass die im Rahmen dieser Studie gewonnenen Proben in pseudonymisierter Form an Institut für Hygiene und Umweltmedizin der Universitätsmedizin Greifswald weitergeben wird. Nach Beendigung der Studie werden meine Proben vernichtet.
Ich erkläre mich weiterhin einverstanden, dass im Rahmen dieser Studie personenbezogene Daten, über mich erhoben und in Papierform sowie auf elektronischen Datenträgern in pseudonymisierter Form aufgezeichnet werden. Soweit erforderlich, dürfen die erhobenen Daten anonymisiert (verschlüsselt) weitergegeben werden.
2. Ich bin darüber aufgeklärt worden, dass ich jederzeit die Teilnahme an der Studie jederzeit und ohne Angabe von Gründen gegenüber dem Prüfarzt/Prüfzentrum widerrufen kann. Im Falle des Widerrufs werden meine Daten gelöscht und meine Proben vernichtet.
3. Ich erkläre mich damit einverstanden, dass meine Daten nach Beendigung oder Abbruch der Studie mindestens zehn Jahre aufbewahrt werden. Danach werden meine personenbezogenen Daten gelöscht, soweit nicht gesetzliche Aufbewahrungsfristen entgegenstehen.
4. Schließlich erkläre ich auch mein Einverständnis für die wissenschaftliche Veröffentlichung der Forschungsergebnisse unter Beachtung der datenschutzrechtlichen Bestimmungen.

.....
Name der Patientin in Druckbuchstaben

.....
Datum

.....
Unterschrift

.....
Name der Prüferin / des Prüfers

.....
Datum

.....
Unterschrift

7.3 Bisherige Veröffentlichungen der Ergebnisse

Accepted: 20 May 2017

DOI: 10.1111/jcpe.12754

EPIDEMIOLOGY (COHORT STUDY
OR CASE-CONTROL STUDY)

WILEY *Journal of Clinical
Periodontology*

Association of salivary peroxidase activity and concentration with periodontal health: A validity study

Maral Memarzadeh Zahedani^{1*}  | Christian Schwahn^{2*} | Romy Baguhl³ |
Thomas Kocher¹ | Harald Below^{3†} | Alexander Welk^{1†}

¹Department of Restorative Dentistry, Periodontology, Endodontology, Preventive and Pediatric Dentistry, Dental School of University Medicine Greifswald, Greifswald, Germany

²Department of Prosthetic Dentistry, Gerodontology and Biomaterials, Dental School of University Medicine Greifswald, Greifswald, Germany

³Institute of Hygiene and Environmental Medicine, University Medicine Greifswald, Greifswald, Germany

Correspondence

Maral Memarzadeh Zahedani, Department of Restorative Dentistry, Periodontology, Endodontology, Preventive and Pediatric Dentistry, Dental school of University Medicine Greifswald, Greifswald, Germany. Email: memarzadem@uni-greifswald.de

Funding information

The study was supported by European regional development Fund: V-630-S-137-2012/024, V-630-F-137-2012/023, V-630-VB243-2012/022 and by bmp bulk medicines & pharmaceuticals production gmbh and by University Medicine Greifswald. The Study of Health in Pomerania (SHIP) is part of the Research Network Community Medicine of the University Medicine Greifswald, which is funded by the German Federal State of Mecklenburg-Vorpommern.

Abstract

Aim: Whereas the relationship between myeloperoxidase and periodontitis has been widely examined that between salivary peroxidase and periodontitis has received little attention. We examined how periodontitis depends on both salivary peroxidase activity and concentration.

Materials and Methods: A full mouth, clinical assessment of probing depth was performed in a sample of 46 participants aged 25–54 years. To minimise bias, these data were corrected by data from the general population (Study of Health in Pomerania). Using five repeated measurements of activity and concentration over 1 day, we assessed daily biological variability and increased the reliability of salivary peroxidase measurements.

Results: Salivary peroxidase activity was associated with probing depth (interquartile range effect = 0.48; robust estimates of 95% confidence interval: -0.90 to -0.31; $p = .0052$) and its effect was not confounded by salivary peroxidase concentration. In turn, the effect of salivary peroxidase concentration was confounded by salivary peroxidase activity, and it was smaller than that of activity.

Conclusions: We found an inverse association between salivary peroxidase activity and probing depth. Thus, our results imply that salivary peroxidase activity could be a protective factor against periodontitis. However, large, well-designed studies are needed to explore the causal mechanisms of this association.

KEYWORDS

bias (epidemiology), enzyme activity, enzyme concentration, periodontal diseases, periodontal pocket, peroxidases, saliva

1 | INTRODUCTION

Periodontitis, along with caries, is the most common cause of tooth loss (Pihlstrom, Michalowicz, & Johnson, 2005). An imbalance between pathogenic dental biofilm and host defence mechanisms leads to the destruction of the periodontium (Darveau, 2010); the imbalance

may arise from risk factors for periodontitis, including age, smoking, and diabetes mellitus (Genco & Borgnakke, 2013).

An important non-specific defence mechanism of the oral cavity comprises the peroxidase enzymes of saliva (Hajishengallis & Russell, 2015). Through their activity and concentration, oral peroxidases (OPOs) control the growth and amount of oral microorganisms (Tenovou, 1998). Furthermore, they prevent the accumulation of cytotoxically acting hydrogen peroxide (H_2O_2 ; Carlsson, 1987) and

*Contributed equally to this work.

†Contributed equally to this work.

inactivate carcinogenic and mutagenic substances (Yamada, Tsuda, Nagao, Mori, & Sugimura, 1979). The OPO consist mainly of salivary peroxidase (SPO), which is synthesised and secreted by the salivary glands (Riva, Puxeddu, del Fiacco, & Testa-Riva, 1978), and to a lesser extent of myeloperoxidase (MPO), which originates from the leucocytes of the gingival sulcus and the saliva (Miyasaki & Nemirovskiy, 1997). Eosinophilic peroxidase as the third salivary peroxidase plays a minor role (Thomas, Jefferson, Joyner, Cook, & King, 1994). Unfortunately, technical descriptions to be found in literature are not always clear about whether the term salivary peroxidase was used to denote OPO in total or SPO in particular (Güven, Satman, Dinccag, & Alptekin, 1996; Rosin, Hanschke, Splieth, & Kramer, 1999; Smith, Smith, Basu, & Walsh, 1984).

Whereas the relation between MPO and periodontitis has been widely examined (Cao & Smith, 1989; Kaner, Bernimoulin, Kleber, Heizmann, & Friedmann, 2006; Nizam et al., 2014) that between SPO and periodontitis has received little attention. MPO activity and concentration are increased in patients with periodontitis compared with periodontally healthy adults (Dagar, Deepa, Molly, Sharma, & Khattak, 2015; Marcaccini et al., 2010). In contrast to MPO, SPO levels are independent of inflammation (Pruitt, Tenovuo, Fleming, & Adamson, 1982). Because of the protective role of SPO against bacterial infection, an inverse association between SPO activity and concentration and periodontal probing depths (PD) may be expected. In fact, Saxén and colleagues reported such an inverse effect for SPO activity (Saxén, Tenovuo, & Vilja, 1990). Others failed to show any relationship between SPO activity and dental plaque, gingival, or periodontal indices (Rosin et al., 1999; Rudney, Krig, Neuvar, Soberay, & Iverson, 1991; Shimizu et al., 2011).

This may be explained by limited validity in terms of selection bias, generalisability, confounding, and measurement error (Rothman, Greenland, & Lash, 2008c), and also limited precision in terms of statistical power and efficiency (Harrell, 2015; Rothman, Greenland, & Lash, 2008b). Highly selected patients reduce generalisability. It is, for example, not sensible to investigate protective effects in subjects who have had the disease for a long time, as the balance between dental plaque and the host defence system has been compromised for many years (Shimizu et al., 2011). Generally, an inappropriate primary outcome may be a threat to study validity because the validity of the measurement depends on the purpose (Porta et al., 2014). Hence, to detect protective effects of exposure, an outcome that reflects subclinical periodontal disease (Demmer, Kocher et al., 2008) may be more valid than an outcome that reflects chronic periodontal disease. Confounding occurs if the effect of SPO is analysed with either SPO activity or SPO concentration (Rosin et al., 1999; Salazar et al., 2013). Measurement error of the exposure results in three inconveniences: it causes bias in exposure estimates, leads to a loss of statistical power, and can mask important exposure features (Carroll, Ruppert, Stefanski, & Crainiceanu, 2006), for example a ceiling effect, which is common for the effect of enzyme concentration on the products of enzyme catalysed reactions (Bisswanger, 2014). To date, there is no study that has examined the reliability of both the SPO activity and concentration at several time points.

Clinical Relevance

Scientific rationale for the study: Although the antimicrobial and protective role of salivary peroxidase in the oral cavity has often been studied, the impact of salivary peroxidase activity and concentration on periodontal probing depth has not yet been investigated.

Principal findings: The results of this study indicate a robust association between salivary peroxidase activity and periodontal probing depth. Thus, low salivary peroxidase activity might represent a higher risk for developing periodontitis.

Practical implications: A deeper understanding of how the salivary peroxidase system functions and its impact on periodontal health could help in providing appropriate prevention and treatment.

We statistically estimated (Greenland et al., 2016) how periodontitis depends on SPO activity and concentration. Using five daily measurements each of activity and concentration, we assessed biological variability and increased the reliability of SPO measurements. To avoid common pitfalls in studying protective effects, we implemented several steps in study design, performance, and analysis. We analysed this association not only in a patient sample but also by referring to the general population, thereby minimising selection bias, increasing generalisability, and reducing uncertainty of effect estimates. For the general population sample, we used data from a population-based study (SHIP) of the same region from which the patients were recruited. As required for investigating the aetiology, we chose a continuous outcome (Rose, 2008) that incorporated the subclinical disease framework (Demmer, Kocher et al., 2008).

2 | MATERIALS AND METHODS

2.1 | Subjects and clinical assessments

From January to August 2015, Caucasians younger than 55 years of age were recruited for a SPO activity and concentration measurement study at the dental school of University Medicine Greifswald. Exclusion criteria were smoking, presence of systemic diseases including diabetes mellitus, pregnancy, having antibiotic treatment, or antiseptic administration within the previous six months, periodontal therapy, and fewer than six first or second molars. This cross-sectional study was reviewed and approved by the Research Ethics Committee of Greifswald University, Faculty of Dentistry (no. BB 015/14). Signed informed consent was obtained from each participant. All fully erupted teeth, except third molars, were assessed, resulting in a maximum of 28 teeth per subject. PD and clinical attachment level (CAL) were determined using CP 15 UNC probes (HU-Friedy Europe, Leimen, Germany) at the mesiobuccal, midbuccal, distobuccal, mesiolingual, midlingual, and distolingual aspects on each tooth. The dental biofilm was visualised with an indicator solution (MIRA-2-TON, Hager

& Werken, Duisburg, Germany) and documented on the basis of the Turesky modified Quigley-Hein Plaque Index (QHI; Turesky, Gilmore, & Glickman, 1970). Gingival inflammation was also measured using the Gingival Index (Loe & Silness, 1963). Coronal caries, including DMF-T, DMF-S, DF-S, and D-S, was examined in a full-mouth design. Dental examinations were performed by one trained and calibrated examiner (M.Z.) after having collected the last saliva sample.

2.2 | Saliva sample collection

Saliva samples were taken five times a day. The participants were asked to avoid eating, drinking, brushing, and flossing 90 min before collecting the unstimulated salivary samples. Saliva collection started at 8:00 and was repeated every 2 hr. Each time, 5 ml of unstimulated saliva was collected into 15-ml sterile plastic tubes at the University of Greifswald dental clinic. The samples were immediately placed on ice and analysed within 30 min at the laboratory of the Institute of Hygiene and Environmental Medicine, Greifswald.

2.3 | Measurements of salivary peroxidase levels

The SPO concentration was determined using an enzyme-linked immunosorbent assay kit (USCN, Life Science Inc.) with a minimum detectable dose of human SPO <8.1 nmol/L (see Supplementary Materials, p. 2).

The SPO activity was assayed spectrophotometrically using *p*-phenylenediamine to generate a chromogen (Rosin et al., 1999). The substrate solution contained 1% *p*-phenylenediamine in phosphate buffer (pH 7.0). First, the OPO activity was determined: sample or calibration standard (0.4 ml) was added to 2 ml of substrate solution in a thermostatic cuvette (25°C). The reaction was started by adding 100 µl H₂O₂ (1.0%), and stopped after 10 min by addition of 1 ml H₂SO₄ (40%), when the absorbance of the solution at 492 nm was measured. For each sample, the assay was duplicated, and the mean of the two values was calculated. Blank assays were also carried out with 100 µl water replacing the H₂O₂. The OPO activity was then calculated using a calibration curve. Second, the MPO activity was determined after adding dapsone, a selective SPO inhibitor (Thomas et al., 1994). Finally, the SPO activity was calculated as the difference between the OPO activity and the MPO activity.

2.4 | Statistical methods

Mean PD served as the primary outcome (Holtfreter et al., 2015), which was modelled by a gamma distribution (Hardin & Hilbe, 2012). For continuous variables, restricted cubic splines with three knots (two coefficients) were chosen and exposure effects presented by calculating interquartile range effects (third quartile versus first quartile, or median of the upper half versus median of the lower half; Harrell, 2015), for which the change by adding confounders was interpreted (Rothman, 2012). The global test of the two exposure coefficients and the test of deviation from linearity are provided.

Using five repeated SPO measurements, intraclass correlation coefficients (ICC) were calculated for a single measurement and the mean of five measurements (Shrout & Fleiss, 1979; see Supplementary Materials for more details).

Several types of external information were taken from the baseline examination of the second cohort of the population-based Study of Health in Pomerania (SHIP-TREND; Völzke et al., 2011), as our study subjects and the SHIP-TREND subjects were drawn from the same region (target population).

A simple technique was chosen to determine the sample size (Senn, 2007), and the sample size of two successful studies (Salazar et al., 2013; Saxén et al., 1990) was considered as a good indicator of the sample size needed. We checked retrospectively whether our study was well powered (Gelman & Carlin, 2014).

Two-sided *p*-values <.05 were considered statistically significant, but over-reliance on *p*-values was avoided (Wasserstein & Assoc, 2016). Instead, confidence intervals (CIs) and the change in the interquartile range effect were interpreted in risk factor analysis and mediation analysis; the latter is expanded upon in Supplementary Materials. Statistical analyses were performed using Stata/MP software, version 14.2 (StataCorp LP, College Station, TX, USA) and R (R Development Core Team, Vienna, Austria).

3 | RESULTS

3.1 | Participant characteristics

For the study, 22 women and 24 men aged 28–53 years were available. The minimum number of teeth was 24. The raw sample differed substantially from that corrected for selection bias in age, education, and caries (DMF-T, DMF-S, DF-S, D-S), but not in terms of gender and clinical periodontal parameters (Table 1; see Supplementary Materials, pp. 3–6).

3.2 | Biological variability of salivary peroxidase levels over time of day

Salivary peroxidase activity depends on the time of day (Figure 1). In a linear mixed model including time of day as a fixed factor (Singer & Willett, 2003), the slope of the time of day was 0.18 U/ml (95% CI: 0.10 to 0.26; *p* < .0001). Some deviation from linearity appeared (Figure 1). However, in a mixed model including linear and quadratic time of day as fixed factors, the quadratic term was not statistically significant (*p* = .06). The ICC of 0.648 increased to 0.671 after adjusting for time of day and to 0.675 after adjusting for time of day and squared time of day. The ICC of 0.648 for a single measurement increased to 0.902 by averaging the five measurements as used in the main analysis.

For SPO concentration, the slope of linear time of day was 0.36 (95% CI: −0.08 to 0.80; *p* = .11). No substantial deviation from linearity appeared. The ICC of 0.673 for a single measurement increased to 0.912 by averaging the five measurements as used in the main analysis.

	Raw sample without weights	Sample corrected for selection bias using relative weights ^a
Age, year	37.5 (32; 44)	42 (33; 47)
Gender, women	22 (48)	(49)
School education		
<10 years	4 (9)	(5)
10 years	30 (65)	(56)
>10 years	12 (26)	(39)
Teeth, number	28 (27; 28)	28 (27; 28)
DMF-T, number	9.5 (3; 16)	12 (6; 20)
DMF-S, number	16.5 (6; 40)	31 (12; 58)
DF-S, number	16 (6; 40)	30 (12; 44)
D-S, number	2 (0; 4)	0 (0; 3)
Attachment loss, mm	2.62 (2.27; 3.16)	2.62 (2.32; 3.17)
Pocket depth, mm	2.48 (2.21; 2.96)	2.48 (2.23; 2.87)
GI	0.39 (0.16; 0.80)	0.40 (0.17; 0.80)
QHI	2.00 (0.93; 2.36)	2.14 (1.20; 2.72)
Mean SPO activity, U/ml	3.03 (2.43; 4.12)	3.10 (2.47; 4.35)
Mean SPO concentration, ng/ml	15.6 (8.72; 19.2)	16.7 (9.74; 20.1)

DMFT, decayed, missing, or filled teeth; DMF-S, decayed, missing, or filled surfaces; DF-S, decayed or filled surfaces; D-S, decayed surfaces; GI, gingival index; QHI, Quigley-Hein plaque index; SPO, salivary peroxidase.

Data are presented as median (1st quartile; 3rd quartile), number (%), or (%).

^aSee additional materials.

TABLE 1 Participant characteristics (N = 46)

3.3 | Salivary peroxidase and probing depth—naïve analysis

The effect of SPO activity on PD was non-linear (Figure 2). The interquartile range effect of SPO activity on PD was attenuated by <5% after adjusting for SPO concentration (Table 2). When additionally including QHI, the point estimator of the interquartile range effect was attenuated by more than 15% but the confidence interval became narrower. When including the gingival index instead of QHI, the point estimator of the interquartile range effect was attenuated by about 40%. Interquartile range effects in the weighted sample were smaller than those of the raw sample, but they were still large.

The interquartile range effect of SPO concentration on PD was moderate to large depending on model and weighting, but statistically not significant (Table 3; Figure 3). It was attenuated by more than 20% after adjusting for SPO activity (Table 3). When additionally including QHI or the gingival index, the interquartile range effect decreased by more than 40%.

3.4 | Measurement error models and sensitivity analyses

Because naïve (conventional) analysis assumes absence of measurement error, selection bias, and confounding (Greenland, 2005), we addressed these types of bias in appropriate models. As expected (Carroll et al., 2006), naïve models corrected for selection bias underestimated

the effect of SPO on PD compared with models that additionally account for measurement error (interquartile range effect: -0.55, 95% highest density interval: -0.85 to -0.27; see Supplementary Materials, pp. 10–17). According to an extensive simulation study using information from SHIP-TREND (see Supplementary Materials pp. 5–6), the selection bias due to missing subjects with fewer than 24 teeth was small.

To interpret the strength of the association in terms of the interquartile range effect, which efficiently compares upper and lower half of the exposure, SHIP-TREND data were used from subjects aged

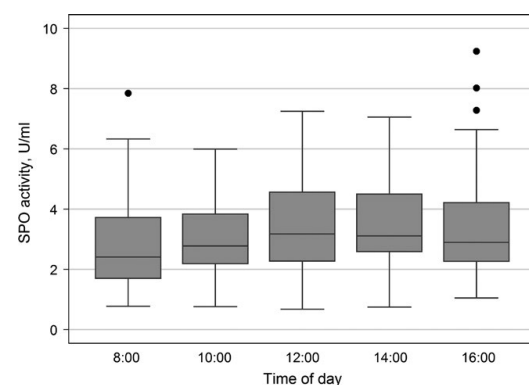


FIGURE 1 Box plot for salivary peroxidase (SPO) activity by time of day (using Stata's standard options)

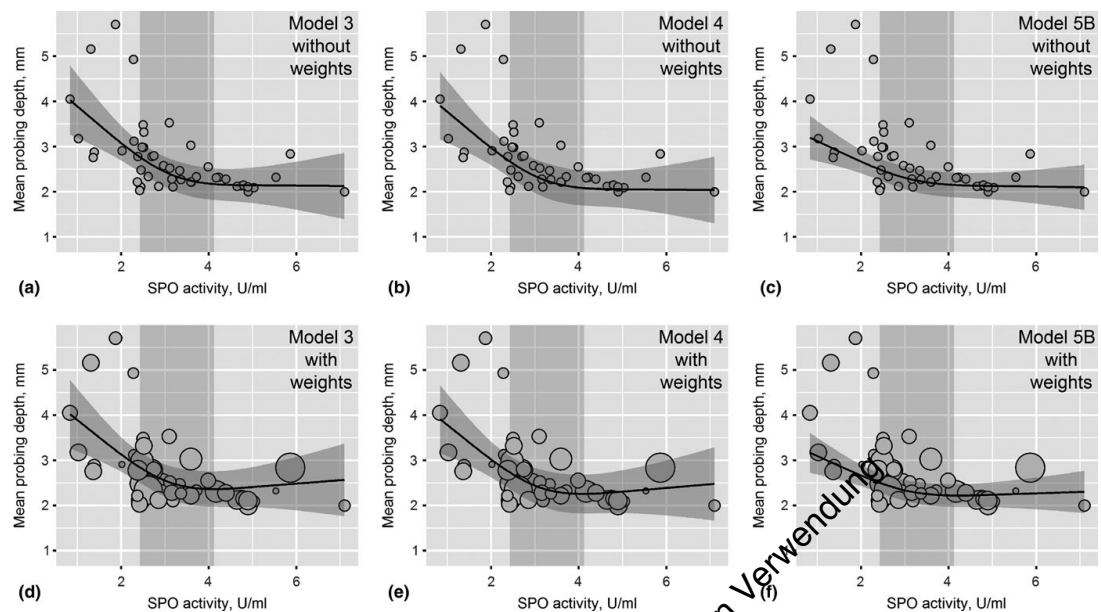


FIGURE 2 Relation between salivary peroxidase (SPO) activity and probing depth adjusted for age, gender, and school education (a, d); for age, gender, school education, and SPO concentration (b, e); and for age, gender, school education, SPO concentration, and gingival index (c, f); in models without weights (a–c) and with weights to correct for selection bias (d–f). The size of the circle is proportional to the weight. Grey box: interquartile range of SPO activity (half of the sample; range between the 1st and 3rd quartile, or median of the lower half versus median of the upper half). DimGrey: 95% confidence interval

TABLE 2 Change in predicted probing depth when salivary peroxidase (SPO) activity changes from its 1st quartile (2.4 U/ml) to its 3rd quartile (4.1 U/ml)

	Risk factor analysis				Mediation analysis	
	Model 1	Model 2	Model 3	Model 4	Model 5A	Model 5B
Without weights						
IQR effect	−0.64	0.66	−0.60	−0.59	−0.48	−0.35
SE of IQR effect	0.16	0.16	0.15	0.15	0.13	0.10
95% CI of IQR effect	−0.98; −0.35	−0.99; −0.36	−0.91; −0.32	−0.90; −0.31	−0.72; −0.23	−0.53; −0.14
Global <i>p</i> -value	.0002	.0001	.0003	.0004	.0006	.0033
<i>p</i> -value for linearity	.0205	.0154	.0151	.0208	.6228	.0591
With relative weights						
IQR effect	−0.48	−0.48	−0.48	−0.48	−0.42	−0.28
SE of IQR effect	0.16	0.16	0.15	0.15	0.12	0.10
95% CI of IQR effect	−0.98; −0.36	−1.00; −0.36	−0.93; −0.33	−0.90; −0.31	−0.72; −0.24	−0.53; −0.14
Global <i>p</i> -value	.0081	.0128	.0060	.0052	.0024	.0220
<i>p</i> -value for linearity	.0069	.0152	.0123	.0139	.3173	.0508

SE, standard error; IQR, interquartile range; CI, confidence interval.

Generalised linear model with gamma family and identity link; robust covariance matrix estimates based on 10,000 bootstrap samples.

Model 1: unadjusted.

Model 2: adjusted for non-linear age and gender.

Model 3: adjusted for non-linear age, gender, and school education.

Model 4: adjusted for non-linear age, gender, school education, and SPO concentration.

Model 5A: adjusted for non-linear age, gender, school education, SPO concentration, and Quigley-Hein plaque index.

Model 5B: adjusted for non-linear age, gender, school education, SPO concentration, and gingival index.

TABLE 3 Change in predicted probing depth when salivary peroxidase (SPO) concentration changes from its 1st quartile (8.7 ng/ml) to its 3rd quartile (19.2 ng/ml)

	Risk factor analysis				Mediation analysis	
	Model 1	Model 2	Model 3	Model 4	Model 5A	Model 5B
Without weights						
IQR effect	−0.23	−0.44	−0.40	−0.29	−0.16	−0.14
SE of IQR effect	0.27	0.27	0.25	0.17	0.11	0.10
95% CI of IQR effect	−0.72; 0.30	−0.94; 0.08	−0.91; 0.06	−0.67; −0.03	−0.41; 0.04	−0.35; 0.02
Global <i>p</i> -value	.6042	.1847	.0851	.2042	.3217	.3015
<i>p</i> -value for linearity	.6958	.3390	.6069	.1196	.6135	.1404
With relative weights						
IQR effect	−0.13	−0.29	−0.27	−0.21	−0.11	−0.11
SE of IQR effect	0.27	0.27	0.25	0.17	0.11	0.11
95% CI of IQR effect	−0.72; 0.30	−0.93; 0.09	−0.89; 0.06	−0.68; −0.03	−0.41; 0.04	−0.41; 0.03
Global <i>p</i> -value	.8250	.4068	.2282	.4052	.6277	.6187
<i>p</i> -value for linearity	.8927	.6308	.8407	.2010	.5744	.5771

SE, standard error; IQR, interquartile range; CI, confidence interval.

Generalised linear model with gamma family and identity link; robust covariance matrix estimation based on 10,000 bootstrap samples.

Model 1: unadjusted.

Model 2: adjusted for non-linear age and gender.

Model 3: adjusted for non-linear age, gender, and school education.

Model 4: adjusted for non-linear age, gender, school education, and SPO activity.

Model 5A: adjusted for non-linear age, gender, school education, SPO activity and Quigley-Hein plaque index.

Model 5B: adjusted for non-linear age, gender, school education, SPO activity and gingival index.

25–54 years of the same region as the patient sample. The effect of ≥ 15 cigarettes per day on probing depth was 0.42 (95% CI: 0.35 to 0.50; $N = 2,015$, adjusted for age, gender, education, and diabetes mellitus) compared with never smokers. In the same model, the effect of high educational level was −0.30 compared with low educational level (95% CI: −0.40 to −0.21; see Supplementary Materials, pp. 17–18).

Sensitivity analyses indicated a minor role of unmeasured confounders, such as markers of systemic inflammation, including plasma fibrinogen levels (see Supplementary Materials, pp. 6–10). Although some overestimation of the effect of SPO activity is likely that of the simultaneous effect of SPO activity and concentration is unclear because there is evidence for an interaction effect (see Supplementary Materials, pp. 18–20). CAL, the secondary outcome, showed similar results (see Supplementary Materials, p. 25).

4 | DISCUSSION

We found a strong association between SPO activity and PD in a sample of healthy non-smokers aged 25–54 years, which is robust to some uncertainty including selection bias, confounding, and measurement error (Greenland, 2005). Besides a strong inverse association, the non-linear dose-response relationship and some specificity for SPO activity, in contrast to SPO concentration, support an association

between SPO activity and PD in the sense of Hill's causal criteria (Rothman, 2012).

For SPO activity measurements, the valid *p*-phenylenediamine method (Rosin et al., 1999) was employed. If other methods are used, namely the photometric analysis methods, the determination of SPO activity can be disturbed by thiocyanate ions (SCN^-), which are an essential component of the saliva; the activity values obtained with these methods are therefore questionable (Mansson-Rahemtulla, Baldone, Pruitt, & Rahemtulla, 1986). In addition to the valid *p*-phenylenediamine method, it is important to differentiate SPO activity from other OPO activities. Invalid SPO measurements may risk failure to discover any association between enzyme properties and oral health, especially because our investigations indicate that high SPO concentration does not necessarily present high SPO activity.

The reliability of a single SPO measurement is good and that of five measurements is excellent (Szklo & Javier Nieto, 2014). For an ICC of at least 0.85 (which is standard in several epidemiological studies, including the Study of Health in Pomerania (John et al., 2001)), three SPO measurements or, if using measurement error models, one SPO measurement and the ICC given in the present study are required. Based on the current results, we recommend sampling time points at 10:00, 12:00, and 14:00. Note that the ICC reached in measurement error models corresponds to a sample size of $N = 71$ using a single SPO measurement (Fleiss, 1986).

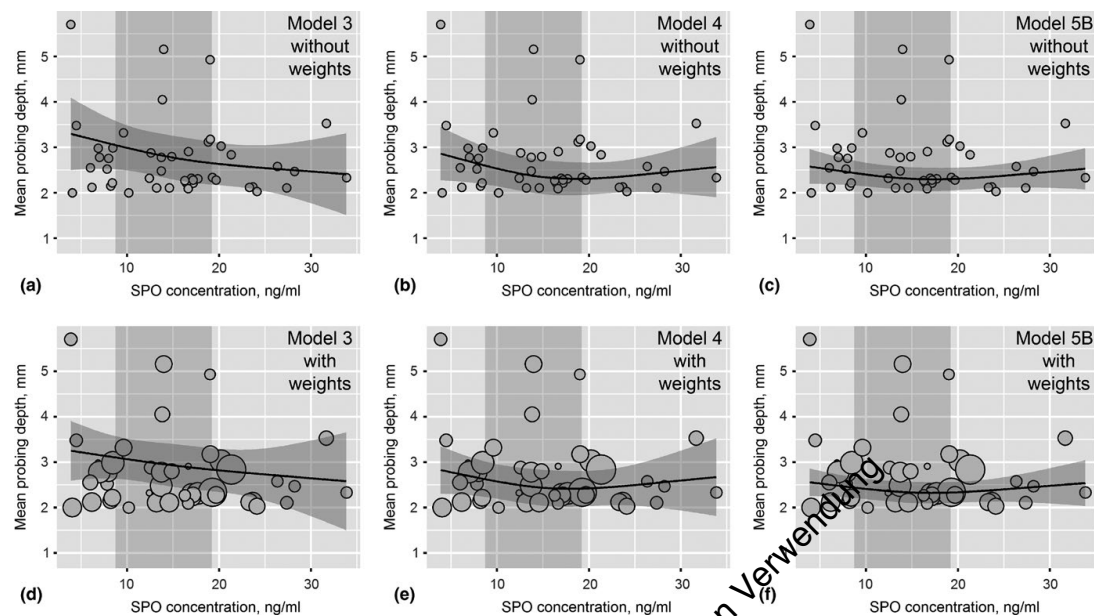


FIGURE 3 Relation between salivary peroxidase (SPO) concentration and probing depth, adjusted for age, gender, and school education (a, d); for age, gender, school education, and SPO activity (b, e); and for age, gender, school education, SPO activity, and gingival index (c, f); in models without weights (a–c) and with weights to correct for selection bias (d–f). The size of the circle is proportional to the weight. Grey box: interquartile range of SPO activity (half of the sample; range between the 1st and 3rd quartile, or median of the lower half versus median of the upper half). DimGrey: 95% confidence interval

Besides valid and reliable measurements, the validity of causal inference requires further conditions, including well-defined exposures. For example, an ill-defined exposure such as obesity cannot be interpreted in terms of a specific treatment (Hernán & Rojans, 2017). Although not a well-defined exposure, SPO activity in the saliva is closer to the criteria for a well-defined exposure than are obesity or systemic inflammation, because it is more specific for oral health. Therefore, the strong SPO effect observed is reasonable.

In the present study, the purpose was to estimate potential preventive effects of SPO activity and concentration on PD. In order to study preventive effects, a primarily non-clinical sample was chosen, and focus was placed on the majority of shallow pockets, but not on the minority of deep pockets, because “the inferences in an epidemiologic study should relate to the general causal theory rather than what happened to a single person” (Rothman, 2012). Adapting Rose’s theory of preventive medicine—which includes the subclinical disease framework (Rose, 2008)—to periodontal disease, Demmer and colleagues have shown that the aetiological burden (*A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, *T. denticola*, *T. forsythia*) in the general population comes mainly from pockets ≤ 3 mm (Demmer, Papapanou, Jacobs, & Desvarieux, 2008b). Therefore, the proportion of pockets ≥ 3 mm as the outcome is favourable in relation to inflammation exposures (Demmer, Kocher et al., 2008). However, we favour the mean PD because it offers a good compromise between epidemiological, statistical, and clinical concepts. The mean reduces not only loss of information but also reflects deep pockets and, therefore,

clinical aspects. The trade-off between epidemiological, statistical, and clinical properties was successful because the mean PD correlates strongly with the proportion of pockets ≥ 3 mm (Spearman correlation = .94). Moreover, appropriate modelling is more important for small samples than for large samples (Lohr, 2010). Thus, we went beyond the normal distribution and chose the gamma distribution.

Valid PD in partial dentures assumes that tooth loss occurred arbitrarily (Schafer & Graham, 2002), although tooth loss mainly depends on caries or periodontitis. Selection bias due to caries or periodontitis on the tooth level, which can be termed “healthy tooth survivor bias”, threatens the validity of the outcome owing to disease-specific incompleteness. But even if tooth loss occurred arbitrarily, the common practice of mean substitution, in which CALs of missing teeth are replaced by subject’s mean CAL is biased, because tooth types differ in CAL (Bourgeois, Bouchard, & Mattout, 2007). The minimum of 24 teeth in this study ensures highly valid outcomes (Holtfreter, Schwahn, Biffar, & Kocher, 2009), which is paramount for answering the research question (Gelman & Hill, 2007), namely whether SPO is inversely associated with subclinical periodontal disease. On the other hand, having sampled a high proportion of fully dentate subjects, we suspected bias by subsidiary conditioning on the outcome, as tooth loss is an effect of periodontitis. This selection bias was corrected both among patients having 24–28 teeth and among subjects having fewer than 24 teeth—using data from the population-based study.

The exposure effects were adjusted for age, gender, and education. Physical activity, obesity, systemic inflammation, alcohol consumption,

and HbA1c may meet the criteria of a confounder (Rothman, 2012), but may not be necessary for a single adjustment set (Pearl, 2009; Vanderweele, 2015). After modelling a variety of relations thought to link SPO and PD, we assume that age, gender, education, systemic inflammation, and HbA1c constitute a minimally sufficient adjustment set. However, the observed SPO effect on PD is large. Thus, a strong correlation between SPO activity and unmeasured confounders is needed to substantially attenuate the association between SPO activity and PD.

Salivary peroxidase concentration did not statistically confound the association between SPO activity and PD, but its association with PD was statistically confounded by SPO activity. The observed interaction between SPO activity and concentration is plausible, but its precise estimation requires a large sample size. Note that the single study that reported an association between SPO activity and PD (more exactly, juvenile periodontitis) did not assess SPO concentration (Saxén et al., 1990). Nevertheless, their findings are basically consistent with ours and support the hypothesis that SPO activity is involved in earlier stages of periodontal disease. An association between SPO activity and gingival health was not found in a sample with 140 males younger than 30 years (Rosin et al., 1999). Salivary samples, however, were frozen and stored up to 2 months, which may invalidate SPO activity measurements. It is also unclear whether SPO was differentiated from MPO.

Our mediation analysis suggests gingival index and, to a lesser degree, plaque as possible pathways between SPO activity and PD, although the expanded mediation analysis in Supplementary Materials is limited by sample size and study design. Unfortunately, we could not differentiate aetiological, putative, and health-associated burden of plaque (Demmer, Papapanou et al., 2008). SPO activity may inhibit aetiological burden and support health-associated bacterial species (Rudney et al., 1991). SPO is able to put selective pressure on oral pathogens and facilitate the growth of health-associated oral species, which are known to participate in fighting bacterially induced inflammation of the periodontal tissues (Ashby, Kreth, Soundarajan, & Siviulu, 2009; Stingl, Eschrich, Rodloff, Schaumann, & Jentsch, 2008). Supposedly, the saliva glands produce adequate SPO, many known or unknown factors may influence the activity of SPO. Although the role of age and smoking has already been studied (Reznick, Klein, Eiserich, Cross, & Nagler, 2003; Salvolini et al., 2000), many other related biological conditions are still to be considered. However, if a gene deficiency, such as that of MPO, is responsible for inter-individual differences in SPO activity (Erciyas, Pehlivan, Sever, & Orbak, 2010), as suggested by the observed non-linear effect, then it would be an enzyme deficiency with a lifetime effect. Provided our results are repeated by larger studies, and the effect of low SPO activity remains as strong as that of heavy smoking as estimated herein by additionally using a large population-based study, early detection of a SPO deficiency could help in providing appropriate prevention and treatment.

The present study has several limitations. First, a single study is of limited value, even if it is an experiment (Longford & Nelder, 1999). Second, the cross-sectional nature of the study severely limits causal inference. Third, the sample size is small, but the study is not underpowered for the direction of the association (see Supplementary Materials). Fourth, subjects in this study were Caucasian, thus limiting the generalisability

of the findings. Fifth, we could only estimate the role of unmeasured confounders. Sixth, unknown confounding could have influenced the results. Finally, we did not pre-specify our complex analyses.

Notwithstanding these limitations, the study has important strengths. We used restriction for risk factors, including age, smoking, and diabetes, as "an extremely effective method of preventing confounding" and an important design strategy to improve study accuracy (Rothman, Greenland, & Lash, 2008a). In contrast to many risk factor studies, the following strengths of study design and analysis were indicated by the protective role of SPO on PD. In terms of study design, we considered epidemiological concepts (Rose, 2008; Rothman, 2012), "which [have] not been traditionally embraced by dental clinicians" (Demmer, Kocher et al., 2008). In fact, we estimated the association between SPO and PD in the general population but balanced epidemiological concepts with statistical and clinical concepts. Regarding analysis, conventional analysis is far too optimistic (Greenland, 2005), and multiple-bias modelling is required, which was done here. Our SPO measurements of both activity and concentration were not only valid but also reliable as we modelled five repeated measurements. Another important strength of the present study was to allow for non-linear associations between PD and SPO, because background knowledge indicated bottom effects.

In summary, within the limitations of this study, we found a robust association between the SPO activity and PD. Thus, our results imply that SPO activity could be a protective factor against periodontitis. However, large, well-designed studies are needed to explore the causal mechanisms of this association.

CONFLICT OF INTEREST

The authors have stated explicitly that there are no conflicts of interest in connection with this article.

REFERENCES

- Ashby, M. T., Kreth, J., Soundarajan, M., & Siviulu, L. S. (2009). Influence of a model human defensive peroxidase system on oral streptococcal antagonism. *Microbiology*, 155, 3691–3700. <https://doi.org/10.1099/mic.0.031310-0>
- Bisswanger, H. (2014). Enzyme assays. *Perspectives in Science*, 1, 41–55. <https://doi.org/10.1016/j.pisc.2014.02.005>
- Bourgeois, D., Bouchard, P., & Mattout, C. (2007). Epidemiology of periodontal status in dentate adults in France, 2002–2003. *Journal of Periodontal Research*, 42, 219–227. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0765.2006.00936.x>
- Cao, C. F., & Smith, Q. T. (1989). Crevicular fluid myeloperoxidase at healthy, gingivitis and periodontitis sites. *Journal of Clinical Periodontology*, 16, 17–20. <https://doi.org/10.1111/j.1600-051X.1989.tb01606.x>
- Carlsson, J. (1987). Salivary peroxidase: An important part of our defense against oxygen toxicity. *Journal of Oral Pathology*, 16, 412–416.
- Carroll, R. J., Ruppert, D., Stefanski, L. A., & Crainiceanu, C. M. (2006). *Measurement error in nonlinear models. A modern perspective*, 2nd ed. (pp. 1, 41–44). Boca Raton: Chapman & Hall/CRC.
- Dagar, M., Deepa, D. K., Molly, M., Sharma, A., & Khattak, B. P. (2015). Effect of nonsurgical periodontal therapy on salivary myeloperoxidase levels: A biochemical study. *Journal of Indian Society of Periodontology*, 19, 531–536. <https://doi.org/10.4103/0972-124X.162199>

- Darveau, R. P. (2010). Periodontitis: A polymicrobial disruption of host homeostasis. *Nature Reviews Microbiology*, 8, 481–490. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2337>
- Demmer, R. T., Kocher, T., Schwahn, C., Völzke, H., Jacobs, D. R. Jr, & Desvarieux, M. (2008). Refining exposure definitions for studies of periodontal disease and systemic disease associations. *Community Dentistry and Oral Epidemiology*, 36, 493–502. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0528.2008.00435.x>
- Demmer, R. T., Papananou, P. N., Jacobs, D. R. Jr, & Desvarieux, M. (2008). Bleeding on probing differentially relates to bacterial profiles: The Oral Infections and Vascular Disease Epidemiology Study. *Journal of Clinical Periodontology*, 35, 479–486. <https://doi.org/10.1111/j.1600-051X.2008.01232.x>
- Erciyas, K., Pehlivan, S., Sever, T., & Orbak, R. (2010). Genetic variation of myeloperoxidase gene contributes to aggressive periodontitis: A preliminary association study in Turkish population. *Disease Markers*, 28, 95–99. <https://doi.org/10.3233/DMA-2010-0689>
- Fleiss, J. L. (1986). *The design and analysis of clinical experiments* (p. 5). New York: John Wiley and Sons.
- Gelman, A., & Carlin, J. (2014). Beyond power calculations: Assessing type S (Sign) and type M (magnitude) errors. *Perspectives on Psychological Science*, 9, 641–651. <https://doi.org/10.1177/1745691614551642>
- Gelman, A., & Hill, J. (2007). *Data analysis using regression and multilevel/hierarchical models*. Cambridge: Cambridge University Press.
- Genco, R. J., & Borgnakke, W. S. (2013). Risk factors for periodontal disease. *Periodontology* 2000, 62, 59–94. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0757.2012.00457.x>
- Greenland, S. (2005). Multiple-bias modelling for analysis of observational data. *Journal of the Royal Statistical Society Series A (Statistics in Society)*, 168, 267–291. <https://doi.org/10.1111/j.1467-985X.2004.00349.x>
- Greenland, S., Senn, S. J., Rothman, K. J., Carlin, J. B., Poole, C., Goodman, S. N., & Altman, D. G. (2016). Statistical tests, P values, confidence intervals, and power: A guide to misinterpretations. *European Journal of Epidemiology*, 31, 337–350. <https://doi.org/10.1007/s10654-016-0149-3>
- Güven, Y., Satman, I., Dincag, N., & Alptekin, S. (1996). Salivary peroxidase activity in whole saliva of patients with insulin-dependent (type 1) diabetes mellitus. *Journal of Clinical Periodontology*, 23, 879–881.
- Hajishengallis, G., & Russell, M. W. (2015). Innate humoral defense factors. In J. Mestecky, W. Strober, M. W. Russell, B. L. Kelsall, H. Cheroutre, & B. N. Lambrecht (Eds.), *Mucosal immunology* (3rd ed. (pp. 251–270). Waltham: Elsevier.
- Hardin, J. W., & Hilbe, J. (2012). *Generalized linear models and extensions*, 3rd ed. (pp. 121–136). College Station: St. Press.
- Harrell, F. E. Jr (2015). *Regression modeling strategies. With applications to linear models, logistic and ordinal regression, and survival analysis*, 2nd ed. (pp. ix, 5, 19, 104). Heidelberg: Springer.
- Hernán, M. A., & Robins, J. M. (2017). *Causal inference* (pp. 34–38). Boca Raton: Chapman & Hall/CRC., forthcoming. Retrieved from https://cdn1.sph.harvard.edu/wp-content/uploads/sites/1268/2016/09/hernanrobins_v1.10.31.pdf [accessed on 03-February-2017]
- Holtfreter, B., Albandar, J. M., Dietrich, T., Dye, B. A., Eaton, K. A., Eke, P. I., ... Kocher, T. (2015). Standards for reporting chronic periodontitis prevalence and severity in epidemiologic studies – Proposed standards from the Joint EU/USA Periodontal Epidemiology Working Group. *Journal of Clinical Periodontology*, 42, 407–412. <https://doi.org/10.1111/jcpe.12392>
- Holtfreter, B., Schwahn, C., Biffar, R., & Kocher, T. (2009). Epidemiology of periodontal diseases in the Study of Health in Pomerania. *Journal of Clinical Periodontology*, 36, 114–123. <https://doi.org/10.1111/j.1600-051X.2008.01361.x>
- John, U., Greiner, B., Hensel, E., Lüdemann, J., Piek, M., Sauer, S., ... Kessler, C. (2001). Study of Health In Pomerania (SHIP): A health examination survey in an east German region: Objectives and design. *Sozial- und Präventivmedizin*, 46, 186–194.
- Kaner, D., Bernimoulin, J. P., Kleber, B. M., Heizmann, W. R., & Friedmann, A. (2006). Gingival crevicular fluid levels of calprotectin and myeloperoxidase during therapy for generalized aggressive periodontitis. *Journal of Periodontal Research*, 41, 132–139. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0765.2005.00849.x>
- Loe, H., & Silness, J. (1963). Periodontal disease in pregnancy. I. Prevalence and severity. *Acta Odontologica Scandinavica*, 21, 533–551. <https://doi.org/10.3109/00016356309011240>
- Lohr, S. L. (2010). *Sampling: Design and analysis*, 2nd ed. (pp. 40–45). Boston: Brooks/Cole, Cengage Learning.
- Longford, N. T., & Nelder, J. A. (1999). Statistics versus statistical science in the regulatory process. *Statistics in Medicine*, 18, 2311–2320. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0258\(19990915/30\)18:17/18<2311:AID-SIM257>3.0.CO;2-T](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0258(19990915/30)18:17/18<2311:AID-SIM257>3.0.CO;2-T)
- Mansson-Rahemtulla, B., Baldone, D. C., Pruitt, K. M., & Rahemtulla, F. (1986). Specific assays for peroxidases in human saliva. *Archives of Oral Biology*, 31, 661–668. [https://doi.org/10.1016/0003-9969\(86\)90095-6](https://doi.org/10.1016/0003-9969(86)90095-6)
- Marcaccini, A. M., Meschiari, C. A., Zuardi, L. R., de Sousa, T. S., Taba, M. Jr, Teofilo, J. M., ... Gerlach, R. F. (2010). Gingival crevicular fluid levels of MMP-8, MMP-9, TIMP-2, and MPO decrease after periodontal therapy. *Journal of Clinical Periodontology*, 37, 180–190. <https://doi.org/10.1111/j.1600-051X.2009.01512.x>
- Miyasaki, K. T., & Nemirovskiy, I. (1997). Myeloperoxidase isoform activities released by human neutrophils in response to dental and periodontal bacteria. *Oral Microbiology and Immunology*, 12, 27–32. <https://doi.org/10.1111/j.1365-302X.1997.tb00363.x>
- Nizam, N., Gumus, P., Pitkanen, J., Tervahartala, T., Sorsa, T., & Buduneli, N. (2014). Human and salivary matrix metalloproteinases, neutrophil elastase, myeloperoxidase in patients with chronic or aggressive periodontitis. *Inflammation*, 37, 1771–1778. <https://doi.org/10.1007/s12033-014-9907-0>
- Peacock, (2009). *Causality. Models, reasoning, and inference*, 2nd ed. (pp. 193–200). New York: Cambridge University Press.
- Pihlstrom, B. L., Michalowicz, B. S., & Johnson, N. W. (2005). Periodontal diseases. *Lancet*, 366, 1809–1820. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(05\)67728-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(05)67728-8)
- Porta, M., Greenland, S., Hernán, M., dos Santos Silva, I., Last, J. M., & Burón, A. (2014). *A dictionary of epidemiology*, 6th ed. (p. 288). Oxford: Oxford University Press.
- Pruitt, K. M., Tenovou, J., Fleming, W., & Adamson, M. (1982). Limiting factors for the generation of hypochlorite ion, an antimicrobial agent, in human saliva. *Caries Research*, 16, 315–323. <https://doi.org/10.1159/000260614>
- Reznick, A. Z., Klein, I., Eiserich, J. P., Cross, C. E., & Nagler, R. M. (2003). Inhibition of oral peroxidase activity by cigarette smoke: In vivo and in vitro studies. *Free Radical Biology and Medicine*, 34, 377–384. <https://doi.org/S0891584902012972> [pii]
- Riva, A., Puxeddu, P., del Fiacco, M., & Testa-Riva, F. (1978). Ultrastructural localization of endogenous peroxidase in human parotid and submandibular glands. *Journal of Anatomy*, 127, 181–191.
- Rose, G. (2008). *Rose's strategy of preventive medicine* (pp. 1–63). New York: Oxford University Press.
- Rosin, M., Hanschke, M., Splieth, C., & Kramer, A. (1999). Activities of lysozyme and salivary peroxidase in unstimulated whole saliva in relation to plaque and gingivitis scores in healthy young males. *Clinical Oral Investigations*, 3, 133–137. <https://doi.org/10.1007/s007840050091>
- Rothman, K. J. (2012). *Epidemiology. An introduction*, 2nd ed. (pp. 141, 223, 250). New York: Oxford University Press.
- Rothman, K. J., Greenland, S., & Lash, T. L. (2008a). Design strategies to improve study accuracy. In K. J. Rothman, S. Greenland, & T. L. Lash (Eds.), *Modern epidemiology* (pp. 168–182). Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins.
- Rothman, K. J., Greenland, S., & Lash, T. L. (2008b). Precision and statistics in epidemiologic studies. In K. J. Rothman, S. Greenland, & T. L. Lash

- (Eds.), *Modern epidemiology*, 3rd ed. (pp. 148–167). Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins.
- Rothman, K. J., Greenland, S., & Lash, T. L. (2008c). Validity in epidemiologic studies. In K. J. Rothman, S. Greenland, & T. L. Lash (Eds.), *Modern epidemiology*, 3rd ed. (pp. 128–147). Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins.
- Rudney, J. D., Krig, M. A., Neuvar, E. K., Soberay, A. H., & Iverson, L. (1991). Antimicrobial proteins in human unstimulated whole saliva in relation to each other, and to measures of health status, dental plaque accumulation and composition. *Archives of Oral Biology*, 36, 497–506. [https://doi.org/0003-9969\(91\)90142-H](https://doi.org/0003-9969(91)90142-H) [pii]
- Salazar, M. G., Jehmlich, N., Murr, A., Dhople, V. M., Holtfreter, B., Hammer, E., ... Kocher, T. (2013). Identification of periodontitis associated changes in the proteome of whole human saliva by mass spectrometric analysis. *Journal of Clinical Periodontology*, 40, 825–832. <https://doi.org/10.1111/jcpe.12130>
- Salvolini, E., Martarelli, D., Di Giorgio, R., Mazzanti, L., Procaccini, M., & Curatola, G. (2000). Age-related modifications in human unstimulated whole saliva: A biochemical study. *Aging (Milano)*, 12, 445–448. <https://doi.org/10.1007/BF03339875>
- Saxén, L., Tenovou, J., & Vilja, P. (1990). Salivary defense mechanisms in juvenile periodontitis. *Acta Odontologica Scandinavica*, 48, 399–407. <https://doi.org/10.3109/00016359009029071>
- Schafer, J. L., & Graham, J. W. (2002). Missing data: Our view of the state of the art. *Psychological Methods*, 7, 147–177. <https://doi.org/10.1037/1082-989X.7.2.147>
- Senn, S. (2007). *Statistical issues in drug development*, 2nd ed. (p. 59). Chichester: John Wiley and Sons.
- Shimizu, E., Kobayashi, T., Wakabayashi, H., Yamauchi, K., Iwatsuki, K., & Yoshie, H. (2011). Effects of orally administered lactoferrin and lactoperoxidase-containing tablets on clinical and bacteriological profiles in chronic periodontitis patients. *International Journal of Dentistry*, 2011, 405139. <https://doi.org/10.1155/2011/405139>
- Shrout, P. E., & Fleiss, J. L. (1979). Intraclass correlations: Uses in assessing rater reliability. *Psychological Bulletin*, 86, 420–428. <https://doi.org/10.1037/0033-2909.86.2.420>
- Singer, J. D., & Willett, J. B. (2003). *Applied longitudinal data analysis: Modeling change and event occurrence* (p. 53). New York: Oxford University Press.
- Smith, A. J., Smith, G., Basu, M. K., & Walsh, T. F. (1984). Changes in salivary peroxidase activity observed during experimentally induced gingivitis. *Journal of Clinical Periodontology*, 11, 373–378.
- Stingu, C. S., Eschrich, K., Rodloff, A. C., Schaumann, B., & Jentsch, H. (2008). Periodontitis is associated with a loss of colonization by *Streptococcus sanguinis*. *Journal of Medical Microbiology*, 57, 495–499. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.47649-0>
- Szklo, M., & Javier Nieto, F. (2014). *Epidemiology: Beyond the basics*, 3rd ed. (p. 340). Boston: Jones and Bartlett Publishers.
- Tenovou, J. (1998). Antimicrobial function of human saliva – how important is it for oral health? *Acta Odontologica Scandinavica*, 56, 250–256. <https://doi.org/10.1080/000163598428400>
- Thomas, E. L., Jefferson, M. M., Joyner, R. E., Cook, G. S., & King, C. C. (1994). Leukocyte myeloperoxidase and salivary lactoperoxidase: Identification and quantitation in human mixed saliva. *Journal of Dental Research*, 73, 544–555. <https://doi.org/10.1177/00220345940730021001>
- Turesky, S., Gilmore, N. D., & Glickman, I. (1970). Reduced plaque formation by the chloromethyl analogue of vitamin C. *Journal of Periodontology*, 41, 41–43. <https://doi.org/10.1902/jop.1970.41.41.41>
- Vanderweele, T. J. (2015). *Explanation in causal inference: Methods for mediation and interaction* (pp. 24–27). Oxford: Oxford University Press.
- Völzke, H., Alte, D., Schmidt, C. O., Radke, D., Lörcher, R., Friedrich, N., ... Hoffmann, W. (2011). Cohort profile: The study of health in Pomerania. *International Journal of Epidemiology*, 40, 294–307. <https://doi.org/10.1093/ije/dyp394>
- Wasserstein, R. L., & Assoc, A. S. (2016). ASA Statement on Statistical Significance and P-Values. *American Statistician*, 70, 131–133. <https://doi.org/10.1080/00031305.2016.1154108>
- Yamada, M., Tsuda, M., Nakai, M., Mori, M., & Sugimura, T. (1979). Degradation of mutagens from pyrolysates of tryptophan, glutamic acid and globulin by myeloperoxidase. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 90, 769–776. [https://doi.org/10.1016/0006-291X\(79\)91894-1](https://doi.org/10.1016/0006-291X(79)91894-1)

SUPPORTING INFORMATION

Additional Supporting Information may be found online in the supporting information tab for this article.

How to cite this article: Memarzadeh Zahedani M, Schwahn C, Baguhl R, Kocher T, Below H, Welk A. Association of salivary peroxidase activity and concentration with periodontal health: A validity study. *J Clin Periodontol*. 2017;00:1–10. <https://doi.org/10.1111/jcpe.12754>

7.4 Verlagserlaubnis

License Number	4142941321495
License date	Jul 06, 2017
Licensed Content Publisher	John Wiley and Sons
Licensed Content Publication	Journal of Clinical Periodontology
Licensed Content Title	Association of salivary peroxidase activity and concentration with periodontal health: A validity study
Licensed Content Author	Maral Memarzadeh Zahedani, Christian Schwahn, Romy Baguhl, Thomas Kocher, Harald Below, Alexander Welk
Licensed Content Date	Jul 5, 2017
Licensed Content Pages	1
Type of Use	Dissertation/Thesis
Requestor type	Author of this Wiley article
Format	Print
Portion	Full article

7.5 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt:

PD Dr. A. Welk für die intensive und zielgerichtete Betreuung dieser Arbeit sowie für die dabei gezeigte unermüdliche Tatkraft;

Dr. C. Schwahn für die wertvollen Anregungen und Ratschläge und für die umfangreiche statistische Bearbeitung der Daten;

PD Dr. H. Below für die freundliche Unterstützung im Rahmen der fachlichen Beratung und für die Durchführung der Laboranalysen;

den Patienten des Zentrums für Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde der Universitätsmedizin Greifswald für ihre freiwillige Teilnahme an der Untersuchung;

Meiner Familie für die liebevolle Unterstützung.